



**HAL**  
open science

# Analyse à haut débit du déterminisme de défauts musculaires impactant la qualité de la viande chez le poulet

Eva Pampouille

► **To cite this version:**

Eva Pampouille. Analyse à haut débit du déterminisme de défauts musculaires impactant la qualité de la viande chez le poulet. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François – Rabelais de Tours, 2019. Français. NNT: . tel-03656670

**HAL Id: tel-03656670**

**<https://hal.inrae.fr/tel-03656670v1>**

Submitted on 2 May 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

# UNIVERSITÉ DE TOURS

## ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Unité Mixte de Recherche Biologie des Oiseaux et Aviculture -  quipe  
Adaptation, Qualité et Sélection

# THÈSE

 présentée par :

**Eva PAMPOUILLE**

soutenue le : **04 juillet 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**ANALYSE A HAUT DEBIT DU  
DETERMINISME DE DEFAUTS  
MUSCULAIRES IMPACTANT LA  
QUALITE DE LA VIANDE CHEZ LE  
POULET**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme LE BIHAN-DUVAL Elisabeth** Directrice de Recherche, INRA, Centre Val de Loire  
**Mme BERRI Cécile** Directrice de Recherche, INRA, Centre Val de Loire

**RAPPORTEURS :**

**Mr GABILLARD Jean-Charles** Directeur de Recherche, INRA, Rennes  
**Mme LE ROY Pascale** Directrice de Recherche, INRA, Rennes

**PRESIDENT du JURY:**

**Mr VOURCH Patrick** Professeur, Université de Tours

**JURY :**

**Mme BERRI Cécile** Directrice de Recherche, INRA, Centre Val de Loire  
**Mme LE BIHAN-DUVAL Elisabeth** Directrice de Recherche, INRA, Centre Val de Loire  
**Mr GABILLARD Jean-Charles** Directeur de Recherche, INRA, Rennes  
**Mme LE ROY Pascale** Directrice de Recherche, INRA, Rennes  
**Mr ROUGER Karl** Chargé de Recherche, INRA-ONIRIS, Angers-Nantes  
**Mr VOURCH Patrick** Professeur, Université de Tours

**MEMBRE INVITE :**

**Mr FAGNOUL Frédéric** Directeur R&D, Hubbard



*« La pensée est un oiseau qui quitte son perchoir et qui s'autonomise. »*

**Axel Kahn**



# REMERCIEMENTS

---

La fin étant très proche, voici donc le moment des remerciements. C'est une lourde tâche que de n'oublier personne, donc je vais faire de mon mieux pour faire une liste exhaustive. Je tiens tout d'abord à remercier en priorité et tout naturellement :

Mes directrices de thèse, **Cécile Berri** et **Elisabeth Le Bihan-Duval**, pour leur confiance, leur gentillesse, leurs conseils avisés, leurs nombreuses relectures des différents travaux réalisés dans cette thèse et leur disponibilité tout au long de ces trois années. Les mots me manquent pour vous exprimer toute ma gratitude. Un immense merci.

Mes différents encadrants chez Hubbard, **Yves Jégo**, **Thomas de Bretagne**, **Maxime Banville** et **Frédéric Fagnoul** pour leur suivi et leur participation au bon déroulement de ces trois années.

Les rapporteurs et membres du jury, **Pascale Le Roy**, **Jean-Charles Gabillard**, **Karl Rouger** et **Patrick Vourch** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

**Christelle Hennequet-Antier**, pour sa sympathie, sa disponibilité ainsi que sa pédagogie et son aide précieuse dans la réalisation de toutes les analyses statistiques menées dans mes différents travaux. Merci pour toutes ces discussions enrichissantes et formatrices qui m'ont fait beaucoup réfléchir. J'ai beaucoup appris auprès de toi, mille mercis pour cela.

**Amélie Juanchich**, pour son soutien précieux durant ces trois années de thèse, ses conseils, ses discussions enrichissantes, sa contribution dans ce travail et sa bonne humeur. Juste un mot : MERCI !

**Christophe Praud**, pour m'avoir initié à l'immunohistochimie et à l'analyse d'images, pour ses discussions intéressantes sur les pathologies du muscle ainsi que ses remarques constructives qui m'ont bien aidé dans les discussions des différentes publications associées à cette thèse.

**Estelle Godet**, pour sa pédagogie, sa disponibilité et son aide précieuse dans toutes mes manip en laboratoire, on est arrivées à bout de ces extractions d'ARN ! Merci également d'avoir partagé avec moi non seulement tes « recettes » de labo, mais également tes recettes de pâtisserie !

**Aurélien Brionne**, pour sa sympathie, sa disponibilité et son aide dans la réalisation des analyses fonctionnelles. Tu en auras tourné des scripts pour moi !

Les membres de l'équipe AQSel, **Jacky Ezagal**, **Sandrine Mignon-Grasteau**, **Elodie Guettier**, **Christelle-Hennequet-Antier**, **Amélie Juanchich**, **Emilie Raynaud**, et **Séverine Urvoix** pour m'avoir rapidement intégré dans l'équipe, pour leur soutien tout au long de ces trois années et leur bonne humeur. J'ai passé de très bons moments avec vous tous.

Les membres de l'équipe MOQA, **Elisabeth Baéza**, **Thierry Bordeau**, **Estelle Cailleau-Audouin**, **Pascal Chartrin**, **Anne Collin**, **Nathalie Couroussé**, **Vincent Coustham**, **Sabine Crochet**, **Estelle Godet**, **Laurence Guilloteau**, **Sonia Métayer-Coustard**, **Christophe Praud**, et **Sophie Tesseraud** pour leur accueil et leur sympathie.

Les ingénieurs R&D d'Hubbard, **Laura François**, **Julien Recoquillay** et **Paula Riboulet** pour leur accueil et leur sympathie, ainsi que de nombreuses personnes de l'équipe administrative pour leur aide dans le bon déroulement de cette thèse, **Manuelle Arribas**, **Sylvie Carrière**, **Marylène Dessienne**, **Emmanuelle Eveno**, **Francisca Jacquin**, **Céline Lecoq**, **Lydie Lenouen** et **Annie Mordelet**.

Les membres de mon comité de thèse, **Anne Bonnieu**, **Laurence Liaubet**, **Sophie Tesseraud**, et **Véronique Santé-Lhoutellier** pour leurs remarques constructives qui m'ont aidé dans le cheminement de ma thèse.

Les membres de l'équipe QUAPA de l'INRA de Theix et plus particulièrement **Sylvie Blinet**, **Thierry Said**, et **Véronique Santé-Lhoutellier** pour leur accueil lors de mon séjour chez eux et leur aide pour les analyses protéomiques.

**Simon Boitard**, pour son accueil lors de mon séjour à l'INRA d'Auzeville et son aide dans les analyses GWAS.

**Marie Bourin** de l'ITAVI, ma future collègue, pour m'avoir fourni une partie des photos qui illustrent ce manuscrit.

Les personnes qui ont successivement partagé mon bureau, **Stéphane Beauclercq**, **Chotima Poompramun** et **Quentin Berger**, vous avez été de supers colocataires ! Un mot tout particulier pour Chotima : « Thank you for your joy and good mood. I hope you'll bring me some mangoes when you come back to France ».

Les doctorants, post-doctorants ainsi que les anciens doctorants, **Stéphane Beauclercq, Quentin Berger, Marion Bournazel, Anaïs Carvalho, Mylène Da Silva, Sarah-Anne David, Marine Dewez, Audrey Gloux, Nathalie Leroy, Sonia Roger, Lilian Stapane,** et **Anne-Sophie Valable** pour leur bonne humeur et les bons moments passés ensemble.

Je pense n'avoir oublié personne. Dans le cas contraire, sachez que je remercie toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ce travail de thèse.

Le mot de la fin revient à mes amis et ma famille, un grand merci à tous pour votre soutien et vos encouragements. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous et notamment à toi Maman ! Je vous suis indéfiniment reconnaissante. Enfin, merci à toi Johan, pour ton soutien au quotidien.



# RESUME

---

Au cours des dernières décennies, on a observé une augmentation notable de la demande de viande de volaille en raison de sa commodité pour la cuisson et la transformation, de ses avantages pour la santé et de son prix peu élevé. Pour répondre à la demande du marché et à l'augmentation de la population mondiale, les producteurs ont dû augmenter leur production tout en réduisant les coûts. En conséquence, la production de poulets de chair est devenue plus efficace grâce à la sélection génétique qui a considérablement contribué à l'amélioration des performances de croissance et des rendements en viande, filet en particulier. Néanmoins, depuis près de dix ans, la filière avicole est confrontée à la présence fréquente de défauts musculaires tels que le white striping (WS), caractérisé par des stries blanches parallèles aux fibres musculaires sur le muscle, et le wooden breast (WB), caractérisé par une hétérogénéité de couleur du filet, un exsudat excessif à la surface du muscle et une perte d'élasticité musculaire. Les conséquences de ces défauts sur la qualité de la viande sont multiples puisqu'ils altèrent l'apparence du filet affectant l'acte d'achat par le consommateur mais aussi leur valeur nutritionnelle et leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, les viandes présentant ces défauts ne peuvent être vendues en frais et sont rétrogradées en mince pour la transformation, ce qui peut être à l'origine de pertes économiques importantes pour la filière et peut conduire à terme à une dégradation de son image. Même s'il est clairement établi que la fréquence et la gravité des défauts augmentent avec la croissance et le rendement en filet des animaux, leur origine précise reste mal comprise.

Différentes analyses génétiques et génomiques (transcriptomique, protéomique) à haut-débit ont été menées en complément de mesures histologiques afin de mieux comprendre l'étiologie des défauts. Les objectifs étaient aussi de contribuer au développement de nouveaux indicateurs et de marqueurs génétiques et biologiques utiles au diagnostic et à la sélection contre ces pathologies musculaires. L'étude a porté sur deux modèles génétiques complémentaires : (1) un modèle original de deux lignées de poulet sélectionnées de façon divergente sur la mesure du pH ultime du filet et qui permettaient d'appréhender les interactions entre sensibilité au WS et métabolisme énergétique du muscle, et (2) une lignée à fort développement musculaire présentant une proportion significative de WS et WB étudiée par comparaison avec une souche à croissance lente indemne de lésions musculaires.

L'analyse GWAS sur le premier modèle d'étude a conduit à des résultats originaux sur l'architecture génétique du défaut WS en identifiant les premières régions QTL chez le poulet. Ces résultats vont dans le sens d'un déterminisme complexe du défaut WS avec plusieurs QTL significatifs agissant sur la variabilité du caractère en plus des nombreux autres gènes à effet faible modélisés au travers de l'effet polygénique. Le déterminisme semble d'autant plus complexe que la recherche de QTL de WS réalisée intra-lignée suggère une interaction avec le statut énergétique du muscle, plusieurs SNP étant significatifs au seuil chromosomique dans la lignée pHu+ mais aucun dans la lignée pHu-. Les approches complémentaires de recherche de QTL et eQTL ont permis de confirmer l'intérêt de certaines régions et mutations candidates, notamment sur le chromosome 17 porteur du gène *LRSAMI*.

La caractérisation moléculaire à haut débit du second modèle d'étude a tout d'abord permis de progresser dans la compréhension de l'étiologie des défauts. Il ressort que la sélection sur la croissance et le rendement en muscle a conduit à une diminution des réserves en glycogène et de la vascularisation du muscle, créant un environnement métabolique et structural favorable aux dérégulations biologiques associées aux myopathies WS et WB. Les différentes approches mises en œuvre ont conduit au développement de nouveaux outils de phénotypage fin des défauts, sous la forme de phénotypes histologiques quantitatifs, et d'un set de marqueurs d'expression génique. Les résultats de la thèse ouvrent de nouvelles perspectives de progrès pour la sélection génétique ou génomique contre les défauts mais aussi la recherche de solutions d'élevage permettant de réduire leur incidence. Les recherches doivent maintenant se poursuivre pour valider les marqueurs et biomarqueurs identifiés dans d'autres populations d'intérêt et progresser dans notre compréhension du déterminisme génétique et biologique des myopathies chez le poulet.

**Mots clés** : poulet, défauts musculaires, qualité de la viande, génétique, génomique, biomarqueurs, sélection

# ABSTRACT

---

During the past few decades, an increase in the demand for poultry meat has been observed due to its convenience for cooking and processing, health benefits, and low price. To answer to the market demand and the world population increase, producers have had to increase their production while reducing the costs. Consequently, the production of broiler chickens has become more efficient thanks to genetic selection, which has contributed significantly to the improvement in growth rate and breast meat yield. Nevertheless, for nearly a decade now, the poultry industry has witnessed an increasing prevalence of broiler breast myopathies such as white striping (WS), which is characterized by white striations parallel to muscle fibers and wooden breast (WB), which results in a heterogeneity of color, excessive surface exudate and a loss of muscle elasticity. The consequences of these defects on meat quality are multiple since they alter breast meat appearance affecting the act of purchase by consumers, as well as its nutritional value and functional properties. Thus, meat with these defects cannot be sold fresh and are downgraded for processing, which can be at the origin of significant economic losses for poultry industry and lead to the degradation of its image. Although it is clear that the frequency and the severity of these defects increase with growth rate and breast muscle yield of animals, their precise etiology remains poorly understood.

Various high-throughput genetic and genomic (transcriptomic, proteomic) studies were carried out in addition to histological measurements to better understand the etiology of WS and WB defects. Our objective was also to contribute to the development of new indicators and genetic and biological markers useful for diagnosis and selection against these muscular pathologies. The study focused on two complementary genetic models: (i) an original model of two divergent chicken lines selected for low and high breast meat ultimate pH that allows to deepen the interactions between sensibility to WS and muscle energy status, and (ii) a line with high breast yield severely affected by both the WS and WB defects and that was studied in comparison with a slow-growing line free from muscle defects.

GWAS analysis on the first animal model studied led to original results on the genetic architecture of the WS defect by identifying the first QTL regions in the chicken. These results are consistent with a complex determinism of the WS defect with several significant QTLs acting on the variability of the character in addition to the many other weak-effect genes modeled through the polygenic effect. Determinism seems all the more complex since the

research of QTL of WS performed intra-line suggests an interaction with muscle energy status, several SNPs being significant at the chromosomal threshold in the pHu+ line but none in the pHu- line. The complementary research approaches of QTL and eQTL have confirmed the interest of certain candidate regions and mutations, mainly on chromosome 17, carrier of the *LRSAMI* gene.

The high-throughput molecular characterization of the second studied model first led to progress in the understanding of biological process underlying breast muscle myopathy. It appears that selection for growth rate and muscle yield led to a decrease in glycogen stores and muscle vascularization, creating a favorable metabolic and structural environment for biological dysregulations associated with WS and WB myopathies. The different approaches used also led to the development of new fine phenotyping tools, in the form of quantitative histological phenotypes, and a set of gene expression markers. The results of the thesis open new perspectives of progress for genetic or genomic selection against the defects but also the search for rearing solutions to reduce their incidence. Research must now continue in order to validate identified markers and biomarkers in other populations of interest and progress in our understanding of the genetic and biological determinisms of myopathies in chicken.

**Key words:** chicken, muscular defects, meat quality, genetics, genomic, biomarkers, selection

# TABLE DES MATIERES

---

Remerciements .....	1
Résumé .....	4
Abstract .....	6
Table des matières .....	8
Liste d'abréviations .....	11
Liste des figures .....	12
Liste des tableaux .....	14
Liste des annexes .....	15
Introduction générale .....	16
<b>Première partie : Étude bibliographique</b> .....	<b>20</b>
I. Une sélection génétique au profit du développement musculaire et du rendement en filet : vers l'émergence de nouveaux défauts technologiques des viandes .....	21
I.1 Une consommation de viande de volaille toujours en progression .....	21
I.2 Une production plus efficace grâce à la sélection génétique .....	23
I.2.1 Organisation de la sélection en volaille de chair .....	23
I.2.2 Évolution des objectifs de sélection et des performances .....	25
I.3 Prévalence de défauts de qualité de viande .....	27
I.3.1 Problèmes liés à la cinétique de chute de pH .....	27
I.3.1.1 Viande Pale, Soft and Exsudative (PSE) et viande acide .....	28
I.3.1.2 Viande Dark, Firm and Dry (DFD) .....	31
I.3.2 Émergence de nouveaux défauts myopathiques .....	31
I.3.2.1 Deep pectoral myopathy (DPM) .....	32
I.3.2.2 White striping (WS), Wooden Breast (WB) et Spaghetti Muscle (SM) .....	33
II. Description des défauts « white striping » et « wooden breast » .....	42
II.1 Caractéristiques histologiques .....	42

II.2 Caractéristiques hématologiques et sérologiques .....	44
II.3 Caractéristiques technologiques.....	44
II.4 Composition chimique et valeur nutritionnelle .....	49
III. Impact des défauts WS et WB pour la filière et les consommateurs.....	52
III.1 Rejet par les consommateurs .....	52
III.2 Altération des propriétés nutritionnelles et technologiques .....	54
IV. Facteurs de variation.....	57
IV.1 Caractéristiques de croissance des animaux et facteurs génétiques .....	57
IV.2 Conditions d'incubation et d'élevage .....	60
IV.3 Conditions d'alimentation.....	61
V. Mécanismes moléculaires mis en jeu.....	64
V.1 Transcriptome .....	64
V.2 Protéome.....	66
V.3 Métabolome .....	67
VI. Conclusion et enjeux pour la filière.....	69
<b>Deuxième partie : Objectifs, modèles animaux et démarches expérimentales.....</b>	<b>72</b>
I. Rappel des objectifs de la thèse .....	73
II. Modèles animaux .....	73
II.1 Les lignées divergentes pHu+/pHu-.....	73
II.2 Souche commerciale à croissance rapide sélectionnée sur le rendement en filet .....	76
III. Démarches expérimentales.....	78
<b>Troisième partie : Étude expérimentale.....</b>	<b>81</b>
Chapitre 1 : Étude génétique du défaut WS.....	82
Cartographie des QTL pour le white-stripping en relation avec le rendement en muscle du filet et les caractéristiques de qualité de la viande chez les poulets de chair - Article 1 .....	82
Chapitre 2 : Nouveaux indicateurs et marqueurs moléculaires des défauts WS et WB.....	113
I. Caractérisation histologique des défauts WS et WB.....	113

II. Analyse du profil protéomique en lien avec l'apparition des défauts WS et WB .....	115
III. Choix du dispositif expérimental pour l'analyse transcriptomique .....	118
IV. Les analyses de l'expression différentielle et de réseaux de co-expression de gènes révèlent des mécanismes moléculaires et des biomarqueurs candidats impliqués dans les myopathies du filet chez le poulet - Article 2 .....	120
<b>Discussion générale</b> .....	173
I. Compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des myopathies WS et WB en lien avec la sélection .....	175
I.1 Impact de la sélection à long terme sur la croissance et le rendement en filet .....	175
I.2 Modifications structurales et moléculaires en lien avec l'établissement des myopathies .....	178
II. Contrôle génétique du défaut WS .....	183
III. Identification d'indicateurs et de biomarqueurs des myopathies WS et WB pouvant servir d'outils de diagnostic dans une perspective d'application en sélection .....	188
III.1 Phénotypes histologiques .....	188
III.2 Phénotypes moléculaires .....	189
<b>Conclusion</b> .....	191
<b>Bibliographie</b> .....	194
<b>Annexes</b> .....	211

# LISTE D'ABREVIATIONS

---

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPK	Protéine kinase AMP-dépendante
ANOVA	Analysis of variance
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Chr.	Chromosome
DDPP	Directions départementales de la protection des populations
DE	Différentiellement exprimé
DFD	Dark firm dry
DPM	Deep pectoral myopathy
eQTL	Expression quantitative trait loci
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
GGP	Grands-grands parentaux
GP	Grands parentaux
GS	Glycogène synthase
GWAS	Genome-wide association study
ITAVI	Institut technique de l'aviculture
MEC	Matrice extracellulaire
Mt	Million de tonnes
PG	Potentiel glycolytique
pH	Potentiel hydrogène
pH15	Potentiel hydrogène à 15 minutes post-mortem
pHu	pH ultime (24h post-mortem)
pHu +	Lignée de poulets sélectionnés pour un pHu du filet élevé
pHu -	Lignée de poulets sélectionnés pour un pHu du filet bas
P. Major	Muscle <i>Pectoralis major</i>
P. minor	Muscle <i>Pectoralis minor</i>
PRE	Pouvoir de rétention d'eau



PSE	Pale soft exudative
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
QTL	Quantitative trait loci
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RN	Rendement napole
ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SM	Spaghetti muscle
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TBA-RS	Thiobarbituric acid-reactive substance index
TEC	Tonne equivalent carcasse
WB	Wooden breast
WS	White striping

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> : Les nombreux avantages de la viande de poulet .....	22
<b>Figure 2</b> : Segmentation de la consommation française de poulet en 2018.....	23
<b>Figure 3</b> : Schéma pyramidal de la filière poulet de chair .....	24
<b>Figure 4</b> : Schéma de croisement à 4 voies .....	25
<b>Figure 5</b> : Évolution de la morphologie des poulets de chair.....	26
<b>Figure 6</b> : Viande acide (A) vs viande DFD (B) .....	28
<b>Figure 7</b> : Deep pectoral myopathy (DPM) .....	32
<b>Figure 8</b> : Filets atteints de white striping sévère .....	34
<b>Figure 9</b> : Classement des filets atteints de white striping (normal (A), modéré (B), sévère (C)) .....	35
<b>Figure 10</b> : Filet normal (A), filet atteint de wooden breast sévère (B), filet atteint de white striping et de wooden breast (C) .....	35
<b>Figure 11</b> : Muscles spaghetti .....	36
<b>Figure 12</b> : Nombre d'articles publiés par an en lien avec les défauts WS, WB et SM chez le poulet .....	39
<b>Figure 13</b> : Principaux pays contributeurs aux publications en lien avec le défauts WS et WB .....	40
<b>Figure 14</b> : Coupe histologique de muscle atteint de WS .....	42
<b>Figure 15</b> : Évolution du pHu du filet au cours de la sélection divergente des lignées pHu ...	74
<b>Figure 16</b> : Incidence de défaut WS modéré ou sévère dans les lignées divergentes pHu+ pHu- évaluées aux 5 <sup>ème</sup> et 6 <sup>ème</sup> générations de sélection .....	75
<b>Figure 17</b> : Organigramme des démarches expérimentales de la thèse .....	80
<b>Figure 18</b> : Coloration Trichrome de Gomori de muscles P. major visuellement indemnes de défaut (A) et atteints de WS sévère (B), WB sévère (C) ou des deux défauts à la fois (D). ..	114
<b>Figure 19</b> : Coloration Trichrome de Gomori de muscle P. major issu de la souche à croissance plus lente X33. ....	118
<b>Figure 20</b> : Mécanismes sous-jacents conduisant à l'établissement des défauts WS et WB dans les souches à croissance rapide .....	182
<b>Figure 21</b> : Co-localisation entre QTL du WS et eQTL de LRSAM1 sur le chromosome 17 .....	184
<b>Figure 22</b> : Co-localisation entre QTL du WS et eQTL de MYH1F sur le chromosome 18.	185

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1</b> : Progrès réalisés sur le poids, l'âge à l'abattage et le rendement en filet des poulets entre 1957 et 2012 .....	27
<b>Tableau 2</b> : Incidence du défaut WS .....	38
<b>Tableau 3</b> : Incidence du défaut WB .....	39
<b>Tableau 4</b> : Propriétés fonctionnelles des filets atteints de WS seul, de WB seul ou des deux défauts par rapport aux filets normaux N .....	45
<b>Tableau 5</b> : Caractéristiques chimiques et nutritionnelles des filets atteints de WS seul, de WB seul ou des deux défauts par rapport aux filets normaux N .....	49
<b>Tableau 6</b> : Facteurs d'élevage influençant l'apparition des défauts WS et WB dans les muscles du filet .....	58
<b>Tableau 7</b> : Analyses transcriptomiques de filets présentant les défauts WS et/ou WB .....	64
<b>Tableau 8</b> : Statistiques descriptives des valeurs de pH, qualité de la viande, croissance et composition corporelle des animaux de la 6 <sup>ème</sup> génération de sélection des lignées pHu+ et pHu-abattus à 6 semaines .....	76
<b>Tableau 9</b> : Caractéristiques de carcasse et de qualité de viande pour les animaux des 4 groupes abattus à 6 semaines .....	78
<b>Tableau 10</b> : Protéines différentielles entre les muscles visuellement indemnes de défauts et les muscles sévèrement atteints par du WS et du WB .....	116
<b>Tableau 11</b> : Marqueurs SNP d'intérêt .....	187

# LISTE DES ANNEXES

---

<b>Annexe 1</b> : Bibliographie personnelle.....	211
<b>Annexe 2</b> : Poster présenté au congrès WCGALP (Auckland) en février 2018.....	212

# INTRODUCTION GENERALE

---

Avec un taux de croissance annuel moyen de 3,4 %, la production mondiale de viande de volaille affiche la plus forte croissance au sein des productions de viandes. Depuis 2017, la volaille est la première viande produite dans le monde avec 118 millions de tonnes (Mt) devant la viande porcine (117 Mt), la viande bovine (70 Mt) et la viande ovine (14 Mt) (ITAVI, 2018). Cet essor des productions avicoles, initié après-guerre, a été concomitant avec la sélection génétique de souches plus productives et l'optimisation des conditions d'élevage et des intrants (en particulier l'alimentation). Depuis maintenant plus de 20 ans, la filière avicole a aussi connu une importante transformation afin de s'adapter aux évolutions des modes de consommation moderne. Ainsi, à l'instar du porc, la viande de poulet est aujourd'hui majoritairement consommée sous forme de produits découpés et élaborés (77% de la consommation du poulet en France en 2018), et de moins en moins sous forme de carcasses entières. Au-delà du rendement en viande, la qualité technologique est donc devenue un facteur clé de compétitivité dans la mesure où elle impacte l'aptitude à la conservation et les rendements à la transformation. Les qualités sensorielle, nutritionnelle et d'image sont également importantes à préserver pour pérenniser le développement des productions avicoles.

Malgré ces enjeux, la qualité de la viande reste mal maîtrisée, sans doute en partie car elle résulte d'interactions complexes entre la génétique et les facteurs d'élevage et d'abattage (Berri, 2004). Ces vingt dernières années, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la cinétique de chute de pH post-mortem et à sa variabilité à l'origine de défauts métaboliques au sein des muscles blancs (glycolytiques) du filet. Ainsi, selon plusieurs enquêtes réalisées sur sites industriels en 2006 et 2007, plus de 30% des filets de poulets standards, principale production de volaille pour les produits de découpe et de transformation, présentent un pH ultime (pHu) inférieur ou égal à 5,7, et peuvent donc être classés comme viande acide (Gigaud *et al.*, 2009). À l'opposé, environ 6% ont un pHu supérieur à 6,2 et peuvent donc être assimilés à des viandes de type Dark, Firm and Dry (DFD). Si les premières peuvent engendrer des mauvais rendements technologiques et des pertes économiques après transformation, les secondes sont susceptibles de poser des problèmes de conservation, en particulier pour les découpes ou les charcuteries crues (Gigaud *et al.*, 2009). Plusieurs études ont démontré l'existence d'un contrôle génétique du pHu de la viande dont l'héritabilité varie entre 0,35 et 0,60 chez des souches à croissance lente (Chabault *et al.*, 2012), intermédiaire (Le Bihan-Duval *et al.*, 2001) ou rapide (Le Bihan-Duval *et al.*, 2008). Ces mêmes études montrent que le pHu est génétiquement fortement relié à la couleur, au pouvoir de rétention d'eau et à la texture du filet. Quel que soit le facteur de variation considéré (alimentation, origine génétique ou mode

d'élevage), il existe une relation positive entre la croissance des fibres musculaires et le pHu de la viande (Berri *et al.*, 2007 ; Berri *et al.*, 2008 ; Baéza *et al.*, 2012) reflétant la diminution des réserves énergétiques du muscle. De ce fait, les pratiques actuelles qui favorisent la production de poulets à croissance rapide, abattus à des poids élevés avec de fort rendement en muscle ont entraîné une évolution vers la production de viande à pH plus élevé.

Les évolutions génétiques et des pratiques telles que la production de poulets lourds ont vu l'émergence de nouveaux types de défauts, affectant l'intégrité musculaire, extrêmement pénalisant pour la compétitivité et la qualité des produits. Il s'agit en particulier des défauts « white striping » (WS), caractérisés par la présence de stries blanches qui se développent parallèlement à l'axe des fibres musculaires (Kuttappan *et al.*, 2009) et « wooden breast » (WB), caractérisés par un muscle dur, visqueux et bombé qui s'accompagne d'une hétérogénéité de coloration, d'un exsudat de surface excessif et d'une perte d'élasticité du muscle (Sihvo *et al.*, 2013). Plus récemment a été décrite une autre forme de défaut structural, caractérisé par une grave perte de cohésion du muscle entraînant une déstructuration importante des fibres musculaires qui se détachent les unes des autres en filaments, lui conférant le nom de muscle « spaghetti » (Sirri *et al.*, 2016 ; Maiorano, 2017). Comme nous le verrons dans la partie bibliographique du manuscrit, les conséquences de ces défauts sur la qualité de la viande sont multiples : altération de l'apparence du filet impactant l'acte d'achat par le consommateur (Kuttappan *et al.*, 2012c), modification de la valeur nutritionnelle de la viande et rendement technologique beaucoup plus faible (Kuttappan *et al.*, 2016). Ainsi, les viandes présentant ces défauts ne peuvent être vendues en frais et sont rétrogradées en minerais pour la transformation, pouvant entraîner des pertes économiques pour la filière. De plus, l'incidence croissante des défauts musculaires, ainsi que les questions de bien-être animal qui en découlent, sont susceptibles de dégrader l'image de la viande de poulet, comme en témoigne le nombre croissant d'articles consacrés à ce sujet dans la presse spécialisée ou générale.

Alors que l'incidence des défauts WS et WB est en forte recrudescence, leur étiologie reste mal comprise et l'industrie demeure en recherche de solutions pour les maîtriser. Les travaux scientifiques menés sur le sujet ont clairement établi un lien défavorable avec la croissance et le rendement en viande. L'augmentation de pHu apparaît également comme un facteur prédisposant dans l'apparition des défauts structuraux. Comme rappelé dans la partie bibliographique à suivre, nombre d'études ont été conduites et permettent aujourd'hui de mieux comprendre certaines des modifications métaboliques et structurales associées aux défauts WS et WB, sans pouvoir encore départager les mécanismes causaux des conséquences observées

au niveau musculaire. L'estimation des paramètres génétiques pour les défauts WS et WB (héritabilités et corrélations génétiques avec des caractères de qualité de la viande et de carcasse) à partir des notations visuelles a permis de démontrer l'existence d'une base génétique de ces myopathies (Bailey *et al.*, 2015 ; Alnahhas *et al.*, 2016). La sélection génétique apparaît donc comme un des leviers possibles pour réduire l'incidence de ce type de défauts, mais elle est pour l'instant insuffisamment exploitée par la filière. Ceci s'explique en partie par la lourdeur des mesures de qualité et l'absence d'indicateurs précoces et de mesures quantitatives pour estimer de manière suffisamment fiable le degré d'atteinte des muscles concernés par ces défauts structuraux.

C'est dans ce contexte qu'a été initié le projet de thèse associant la caractérisation génétique, moléculaire et histologique des défauts white striping et wooden breast chez le poulet. Les objectifs étaient d'une part de mieux comprendre les voies métaboliques et structurales impliquées mais aussi de développer des outils utiles à la sélection génétique ou génomique et à l'élevage, sous la forme de nouveaux indicateurs et de marqueurs génétiques ou biologiques. La démarche scientifique s'est appuyée sur des approches haut débit, de génétique d'association et de génomique (transcriptome, protéome), réalisées en complément d'analyses histologiques permettant l'évaluation fine des défauts.

Comme décrit dans la première partie expérimentale de la thèse, l'analyse de génétique d'association (GWAS) menée sur des lignées sélectionnées de façon divergente pour le pHu aura permis d'identifier pour la première fois chez le poulet des régions du génome (QTL) contrôlant le défaut WS et de suggérer plusieurs gènes candidats potentiellement causaux. Ces premiers résultats suggèrent une possible interaction entre le contrôle génétique du défaut et le statut métabolique de l'animal, au travers de ses réserves énergétiques. La seconde approche expérimentale, menée sur une souche à fort développement musculaire, apporte des résultats originaux sur les possibilités d'un phénotypage fin, histologique et moléculaire des défauts. L'analyse intégrée de l'ensemble des résultats et leur mise en perspective dans le contexte de la sélection avicole ont été étudiées dans la discussion de la thèse.



PREMIERE PARTIE :  
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

# **I. Une sélection génétique au profit du développement musculaire et du rendement en filet : vers l'émergence de nouveaux défauts technologiques des viandes**

Les critères de sélection du poulet ont été adaptés au cours des dernières décennies pour suivre l'évolution du marché et de la demande des industriels et des consommateurs. En lien avec ces évolutions, plusieurs défauts de qualité sont apparus, altérant l'intégrité et la composition des muscles, essentiellement au niveau du filet. Les premières problématiques technologiques chez les poulets de chair étaient, à l'instar du porc, principalement liées à des variations importantes de métabolisme énergétique, qui influencent la chute de pH qui se produit dans le muscle après la mort des animaux. Ces défauts altéraient l'intégrité des critères de qualité des viandes de volaille (i.e., couleur, pouvoir de rétention d'eau, texture, oxydation) et affectaient principalement l'aptitude à la transformation des viandes. En revanche, depuis une dizaine d'années, la filière volaille est confrontée à la recrudescence de nouveaux défauts, qui impactent en particulier l'intégrité musculaire des souches de poulets à croissance rapide et à fort rendement en filet. La fréquence de ces défauts, qui s'apparentent à des myopathies, est de plus en plus importante dans les abattoirs, y compris français. De ce fait, ces défauts font l'objet d'une attention croissante et sont devenus en quelques années la problématique majeure de qualité des industriels de la filière.

## **I.1 Une consommation de viande de volaille toujours en progression**

Depuis plusieurs décennies, la viande de volaille est la production qui affiche la plus forte croissance au niveau mondial au sein des productions de viandes. Depuis les années 2000, son taux de croissance annuel moyen est de 3,4% contre 1,6% pour la viande porcine, 1,5% pour la viande ovine et 0,95% pour la viande bovine (ITAVI, 2018).

En 2017, la consommation européenne de volaille était de 14 millions de tonnes équivalent-carcasse (TEC) (1,86 million de TEC en France) et la consommation par habitant était en moyenne de 27kg équivalent-carcasse (27,7kg/h en France). Ce sont les consommations de viandes de poulet qui sont en hausse (+ 4,5% en 2017) tandis que les autres espèces de volailles sont en repli comme pour la dinde (- 2,3% en 2017), la pintade (- 3% en 2017) et le canard gras (- 9,5% en 2017). L'augmentation de la consommation de viande de volaille s'explique par plusieurs facteurs. Depuis quelques années, la production et le marché de la viande ont subi plusieurs événements négatifs qui ont altéré l'image de la viande et des produits carnés. En

raison de leurs teneurs parfois fortes en lipides, en acides gras saturés, en cholestérol, et en sodium, ces derniers ont été associés à des maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète sucré ou encore certains cancers. De plus, la réduction de la consommation de viande a été accentuée par une série de scandales et de problèmes de santé animale qui ont affecté les productions animales, tels que l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), les dioxines dans la viande et l'influenza aviaire. Dans ce contexte, la viande de volaille a su conserver son attractivité par rapport aux autres espèces en raison de plusieurs facteurs (**Figure 1**).



**Figure 1** : Les nombreux avantages de la viande de poulet

Ainsi, elle constitue une excellente source de protéines animales (environ 31% du poids du filet en moyenne) plébiscitée puisque rapide et efficace à produire. De plus, son coût attractif et son absence de contraintes culturelles ou religieuses la rendent plus compétitive sur le marché de la viande (Kennedy *et al.*, 2004). Enfin, c'est une viande plutôt maigre (environ 1,3% de matières grasses dans le blanc de poulet, jusqu'à 4% dans la cuisse), avec un taux élevé en acide gras insaturés, et une faible teneur en sodium et cholestérol. Elle est donc recommandée au Royaume-Uni pour diminuer la fréquence des insuffisances coronariennes (Davis and Stewart, 2002). De plus, le dépôt de gras chez la volaille est principalement associé à la peau, ce qui facilite son élimination, réduisant ainsi considérablement la consommation de graisse. Par ailleurs, la production de volaille est moins liée au sol que celle des ovins ou des bovins, ce qui facilite son développement dans les zones péri-urbaines avec une forte croissance démographique (OCDE-FAO, 2016).

La viande de volaille est aujourd'hui majoritairement consommée sous forme de morceaux découpés et, à l'instar de la viande de porc, largement utilisée pour la transformation en produits

élaborés. En revanche, elle est de moins en moins consommée sous forme de carcasses entières (Figure 2).

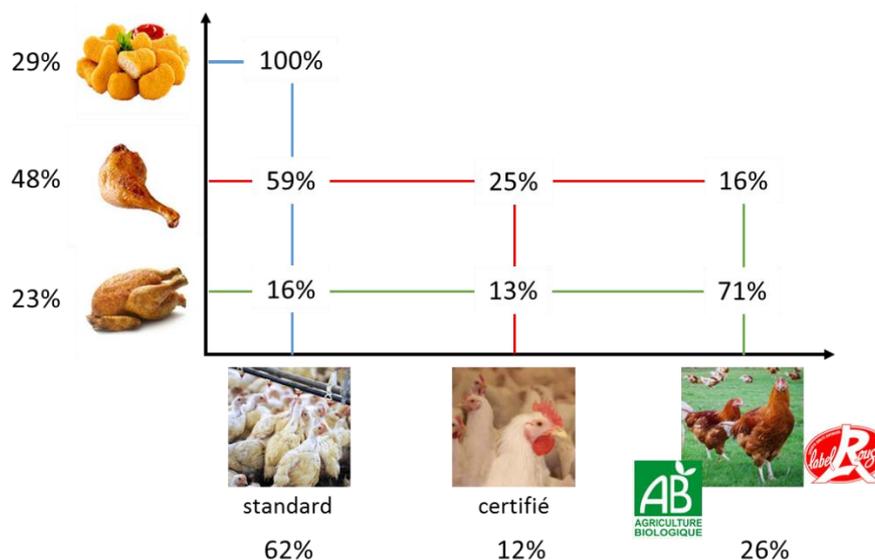


Figure 2 : Segmentation de la consommation française de poulet en 2018

En France, la production en systèmes alternatifs (Label Rouge, Agriculture Biologique) reste significative, ce qui tend à préserver la consommation des poulets entières (23% en 2018 contre 36 % en 2008 et 52 % en 1998). Pour autant, la grande majorité de la viande de volaille est issue de la production standard (62%) et est destinée à la production de découpe et de produits élaborés, dont la consommation respective est de 48 et 29% (ITAVI, 2018).

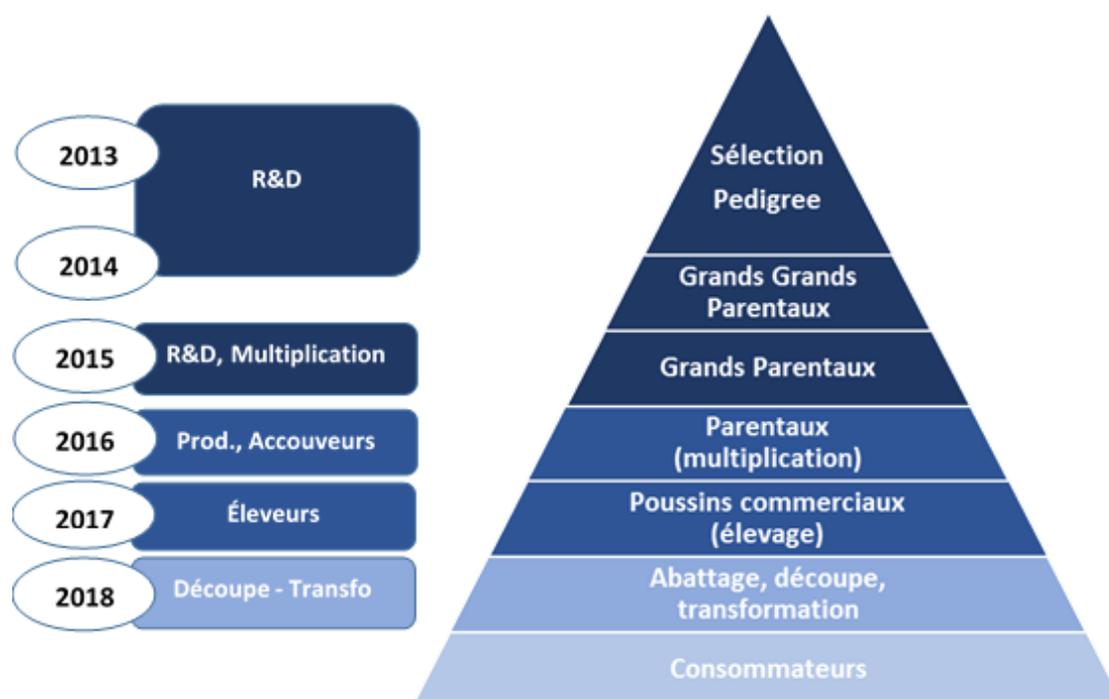
L'essor de la production de viande de volaille a été concomitant avec la mise en place d'une filière de production très efficace, basée sur l'utilisation d'une génétique très productive et l'optimisation des intrants (notamment l'alimentation). Après des décennies de progrès en termes de productivité, la filière doit aujourd'hui intégrer de nouvelles attentes en termes de qualité des produits (rendement en viande, propriétés fonctionnelles, capacité de stockage, perception sensorielle, valeurs nutritionnelles) mais aussi d'image de la filière (bien-être animal, durabilité).

## I.2 Une production plus efficace grâce à la sélection génétique

### I.2.1 Organisation de la sélection en volaille de chair

La filière avicole est organisée selon un schéma pyramidal (Figure 3). Le haut de la pyramide représente les entreprises de sélection (faible nombre de sociétés privées), qui mettent en œuvre

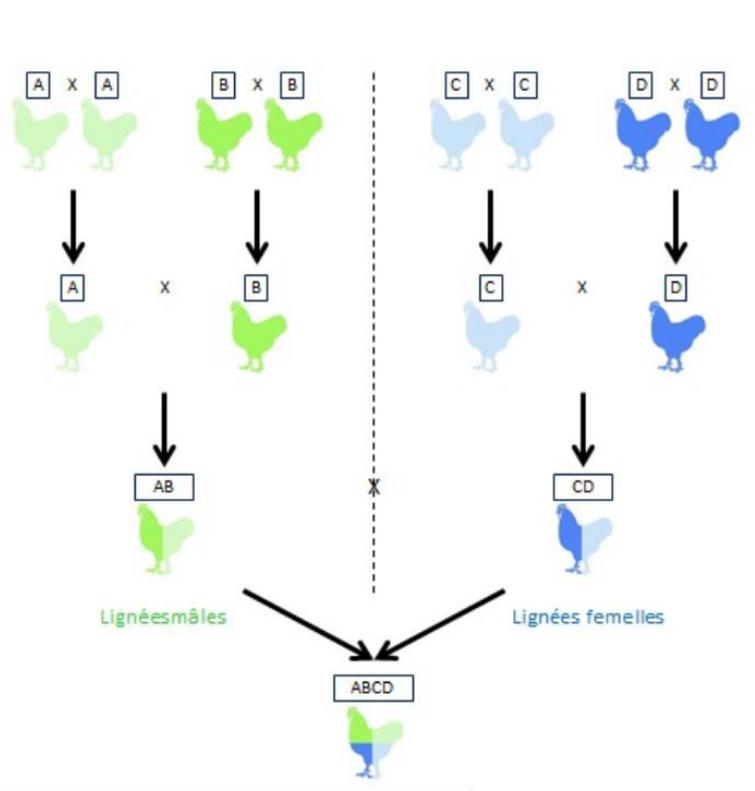
l'ensemble des opérations nécessaires à la sélection des animaux en lignées pures (pedigree) : définition des objectifs de sélection, évaluation génétique ou génomique et choix des futurs reproducteurs. Les lignées pures alimentent également la production des troupeaux de multiplication, sous la forme de Grand Grand Parentaux (GGP), de Grand-Parentaux (GP) puis de Parentaux. Cette organisation pyramidale ainsi que les particularités biologiques des espèces avicoles (bonne prolificité et faible intervalle entre générations) permettent de diffuser très efficacement le progrès génétique, puisqu'un individu mâle reproducteur de lignée pure aboutit à la production de plusieurs centaines de milliers de poulets de chair. Néanmoins, il faut environ 5 ans pour que les orientations prises au niveau de la sélection impactent les caractéristiques du poulet terminal.



**Figure 3** : Schéma pyramidal de la filière poulet de chair

Le schéma pyramidal repose le plus souvent sur le croisement de quatre lignées pures, deux lignées représentant la voie mâle (les lignées A et B) et deux lignées représentant la voie femelle (les lignées C et D) (**Figure 4**). Les pondérations de sélection diffèrent entre ces deux voies, avec classiquement un poids plus important accordé aux caractères de croissance et rendement en viande sur la voie mâle par rapport à la voie femelle, où l'on accorde un poids plus important à la reproduction. Le croisement d'animaux GP des lignées mâles A et B permet la production du coq parental, alors que le croisement d'animaux GP des lignées C et D aboutit à la production

de la femelle parentale. Ce croisement permet de bénéficier des effets d'hétérosis particulièrement importants pour les caractères de reproduction et d'avoir des performances de ponte supérieures chez la femelle parentale par rapport à sa mère grand-parentale. In fine, du fait de la complémentarité entre les deux voies, le croisement entre mâle et femelle de type parental permet de produire des poussins terminaux en grand nombre et avec les caractéristiques de production recherchées.

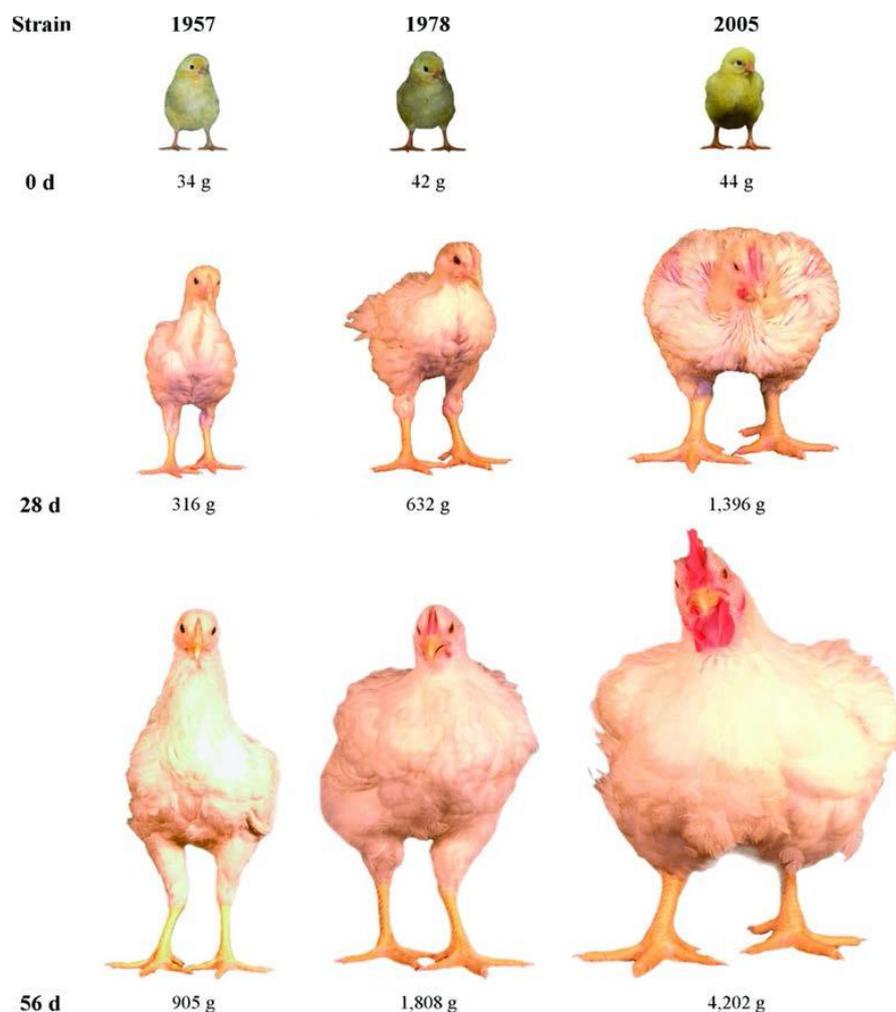


**Figure 4 :** Schéma de croisement à 4 voies (Novogen, Groupe Grimaud)

### I.2.2 Évolution des objectifs de sélection et des performances

Au cours des 50 dernières années, les critères de sélection du poulet ont été adaptés pour suivre l'évolution de la demande du marché en lien avec la démographie mondiale et les modes de consommation. Avant la seconde guerre mondiale, les volailles étaient commercialisées en vif et les poulets de chair sélectionnés en fonction de caractères simples mesurés sur les animaux vivants, comme le poids vif. Par la suite, la volaille a commencé à être vendue sous forme de carcasses entières, entraînant un intérêt économique croissant pour la sélection des animaux selon leur rendement en carcasse. Il y a environ 40 ans, la demande du marché en morceaux découpés a augmenté, orientant la sélection sur des critères de composition corporelle, tels que

les rendements en filets et en cuisses. Notons que le pourcentage de gras abdominal a aussi fait partie des critères d'intérêt, comme indicateur de l'état général d'engraissement des animaux, à maîtriser chez les animaux à croissance rapide. Enfin, au cours des deux dernières décennies, la demande croissante en produits transformés associée à une préférence pour la viande de filet dans les pays occidentaux, a accentué la pression de sélection sur le rendement en filet qui n'a cessé d'augmenter (Petracci *et al.*, 2015). Les caractères de croissance et de composition corporelle bénéficiant d'un niveau d'héritabilité modéré à fort, la sélection appliquée sur les souches standards a conduit à des progrès spectaculaires (**Figure 5**). Ainsi entre 1957 et 2005, le poids a été multiplié par 4 et le rendement en filet augmenté de 82% après 42 jours d'élevage (Zuidhof *et al.*, 2014).



**Figure 5** : Évolution de la morphologie des poulets de chair (Zuidhof *et al.*, 2014)

Les progrès génétiques réalisés au cours des 50 dernières années ont largement amélioré l'efficacité de la production, liée d'une part à l'amélioration de l'efficacité alimentaire des

animaux (sélectionnée au travers de l'indice de consommation) et au raccourcissement de leur durée d'élevage. Aujourd'hui, la production d'animaux au poids du marché (environ 2kg) nécessite moitié moins de temps (environ 40 jours ou moins) que dans les années 1950 (Havenstein *et al.*, 2003 ; Petracci *et al.*, 2015) (**Tableau 1**). Au cours des 10 dernières années, le rendement en filet des souches de poulet modernes a augmenté de 5 points (Petracci *et al.*, 2015). Il dépasse actuellement le cinquième du poids du poulet, avec des rendements en filets compris entre 20 et 25% du poids vif selon l'âge et le poids à l'abattage (Baéza *et al.*, 2012 ; Petracci *et al.*, 2015).

**Tableau 1** : Progrès réalisés sur le poids, l'âge à l'abattage et le rendement en filet des poulets entre 1957 et 2012 (Petracci *et al.*, 2015)

Année	Souche	Poids vif (g)	Age (jours)	Poids du filet (g)	Rendement filet (%)
1957	Athens	2078	57	280	13,5
2001	Ross 308	2207	43	349	15,8
2007	Ross 308	2200	36	410	18,6
2012	Ross 308	2200	35	464	21,1

Ces évolutions considérables des performances de production ont conduit à des changements notables des caractéristiques anatomiques et physiologiques des animaux. Il est maintenant bien établi que la sélection pour une augmentation de la croissance musculaire a eu pour conséquence une hypertrophie des fibres. Au niveau métabolique, des diminutions de la teneur en glycogène et en pigment héminique (reflet de la vascularisation) du muscle ont aussi été révélées (Le Bihan-Duval and Berri, 2017 ; Petracci *et al.*, 2017). Dans le même temps et avec l'augmentation de l'usage des viandes de volailles pour la transformation sont apparus des défauts de qualité liés au métabolisme post-mortem et à la cinétique de chute du pH puis, plus récemment, à l'intégrité musculaire.

## I.3 Prévalence de défauts de qualité de viande

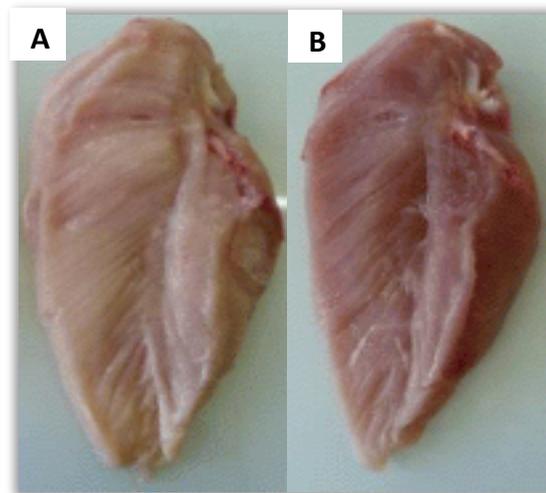
### I.3.1 Problèmes liés à la cinétique de chute de pH

Le pH occupe un rôle central dans la transformation du muscle en viande. Il influence les propriétés sensorielles de la viande de volaille, sa durée de conservation, et plus généralement ses propriétés physico-chimiques durant la transformation. Ce sont à la fois la vitesse et l'amplitude de la chute de pH qui sont déterminantes pour la qualité de la viande. Celles-ci peuvent-être évaluées au travers de la mesure du pH à 15 minutes (pH15) et du pHu à 24 heures post-mortem. Chez le poulet, le pHu est en grande partie déterminé par les réserves en



glycogène du muscle au moment de l'abattage, estimées par le potentiel glycolytique ou PG (Le Bihan-Duval *et al.*, 2008). Plus ces réserves sont élevées, plus le pHu de la viande sera bas et la viande acide. La vitesse initiale de chute de pH est quant à elle influencée par l'activité physique de l'animal avant sa mort, en particulier l'intensité des battements d'ailes et des redressements sur la chaîne d'abattage (Debut *et al.*, 2003 ; Berri *et al.*, 2005 ; Debut *et al.*, 2005).

Au cours des 30 dernières années, il a été observé une augmentation de défauts technologiques et sensoriels liés à la cinétique de chute de pH post-mortem (**Figure 6**). Ces défauts, qui concernent essentiellement les muscles blancs du filet dont le métabolisme est purement glycolytique, influencent l'intégralité des critères de qualité des viandes de volailles (i.e., couleur, pouvoir de rétention d'eau, texture, susceptibilité à l'oxydation). Ainsi, il est fréquent d'observer des viandes dont le pH chute rapidement et/ou le pHu est bas ( $\leq 5,7$ ), qui présentent un faible pouvoir de rétention d'eau, et de ce fait sont peu adaptées à la transformation. C'est le cas des viandes Pale, Soft and Exudative (PSE) ou acides. À l'inverse, les viandes Dark, Firm and Dry (DFD), qui ont un pHu élevé ( $> 6,2$ ), présentent un fort pouvoir de rétention d'eau (PRE) mais sont peu adaptées à la conservation en cru. Comme nous le verrons par la suite, chez le poulet ces défauts présentent un fort déterminisme génétique (Le Bihan-Duval *et al.*, 2008) mais peuvent également être modulés par les conditions d'élevage.



**Figure 6** : Viande acide (A) vs viande DFD (B) (UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture)

#### *1.3.1.1 Viande Pale, Soft and Exsudative (PSE) et viande acide*

Les viandes PSE ont une chute de pH rapide après la mort, avec un pH15 très souvent inférieur à 6. Les viandes acides, quant à elles, ont un pH15 normal et un pHu plus bas que la normale

(pHu < 5,7). La prolongation de la glycolyse anaérobie post-mortem due à un stock en glycogène musculaire plus important que la normale est responsable de ce pHu bas. Il est important de dire que l'incidence du caractère PSE est difficilement estimable chez les volailles. En effet, aucune caractéristique mis à part le pH15, la plupart du temps non mesuré en abattoir ou durant les expérimentations, ne permet de distinguer ces viandes des viandes acides. C'est pourquoi les études font souvent référence à la dénomination de viande PSE-like, sachant que si l'origine du défaut est distincte (problème de vitesse ou d'amplitude de chute de pH), les impacts sur la qualité sont proches.

Les viandes PSE-like sont caractérisées par une couleur pâle (**Figure 6**), une texture molle et un faible pouvoir de rétention d'eau (Barbut *et al.*, 2008 ; Petracci and Cavani, 2012). Elles ont une perte en eau assez conséquente lors de la cuisson et durant le stockage, ce qui les rend dures et peu juteuses une fois cuites. En raison de leur faible pouvoir de rétention d'eau, elles ont une capacité de transformation médiocre. Comme évoqué précédemment, seule la cinétique de chute de pH permet de différencier les viandes acides des viandes PSE.

L'apparition des viandes PSE-like en volaille a été pour la première fois mentionnée il y a une vingtaine d'années (Barbut, 1997 ; Solomon *et al.*, 1998), alors que les premières descriptions de viandes PSE ont été réalisées chez le porc dans les années 1960 (Briskey, 1964). En effet, le terme PSE était utilisé à l'origine pour décrire chez le porc une viande caractérisée par une couleur plus claire et une texture plus molle que la normale, avec une faible capacité de rétention d'eau et un rendement technologique réduit. Chez le porc, les viandes PSE ont été largement étudiées au cours de ces vingt dernières années et leur étiologie est aujourd'hui bien connue (Solomon *et al.*, 1998 ; Barbut *et al.*, 2008). La chute de pH rapide couplée à une température musculaire encore élevée explique l'apparition du défaut PSE. Un facteur génétique a été identifié chez le porc : le gène de sensibilité à l'halothane (i.e., HAL, gène autosomal récessif). Plus précisément, la mutation se situe au sein de l'isotope 1 du récepteur à la ryanodine (*RYR1*), canal calcique du réticulum endoplasmique impliqué dans la libération de Ca<sup>2+</sup>. Cette mutation entraîne une libération de Ca<sup>2+</sup> deux fois supérieure à la normale, conduisant à l'activation du métabolisme contractile musculaire et à la production accélérée de lactate et de protons H<sup>+</sup> par la glycolyse anaérobie (Barbut *et al.*, 2008). Ces protons influencent la conformation et la charge des protéines, affectant la capacité de rétention d'eau, la texture et la couleur des viandes PSE. Cette mutation est associée au syndrome de stress porcin, caractérisé par une hyperthermie déclenchée par le stress, qui peut conduire à la mort de l'animal. Le test de sensibilité à l'halothane (un gaz anesthésiant) a été utilisé chez le porc pour repérer les animaux sensibles,

homozygotes pour la mutation récessive, qui développent au bout de quelques minutes ce syndrome d'hyperthermie maligne associé à une contracture musculaire généralisée. Les études réalisées chez la dinde et le poulet n'ont pas permis de montrer l'intérêt du test de sensibilité à l'halothane pour la détection des animaux prônes à développer des viandes PSE liées à une vitesse de chute excessive du pH (Wheeler *et al.*, 1999 ; Owens *et al.*, 2000 ; Cavitt *et al.*, 2004) et il n'existe pas d'argument à ce jour pour indiquer un rôle du gène *RYRI* chez la volaille. Chez le poulet, il semble que la vitesse de chute du pH soit principalement liée au comportement des animaux sur la chaîne d'abattage, en particulier chez les souches à croissance lente plus réactives (Debut *et al.*, 2003 ; Berri *et al.*, 2005 ; Debut *et al.*, 2005). L'analyse génétique de ce type de souche a d'ailleurs montré que la durée des battements d'aile sur la chaîne d'abattage était un caractère héritable ( $h^2=0,41$ ), fortement négativement corrélé avec la valeur du pH15 ( $r_g = -0,71$ ) (Chabault *et al.*, 2012).

Chez le porc, un second gène majeur responsable des viandes acides a également été identifié. Il s'agit du gène *RN*, pour Rendement Napole, de type autosomal et dominant (Le Roy *et al.*, 1990). Les travaux de génétique moléculaire ont permis l'identification de la mutation causale, au sein du gène *PRKAG3*, qui conduit à une augmentation du contenu en glycogène des muscles et donc à un pHu bas (Milan *et al.*, 2000). Ceci provoque une dénaturation partielle des protéines, un pouvoir de rétention d'eau plus faible et un faible rendement à la transformation (Barbut *et al.*, 2008). *PRKAG3* code pour une isoforme spécifique du muscle d'une sous-unité régulatrice de l'AMPK (protéine kinase AMP-dépendante), qui intervient dans l'équilibre énergétique de la cellule, en inhibant la glycogène synthase (GS) et en activant la glycogène phosphorylase (PYG). Chez le poulet, l'expérience de sélection divergente sur le pHu du filet a permis de montrer un fort déterminisme génétique du pHu ( $h^2 = 0,57$ ) (Alnahhas *et al.*, 2014) mais aussi de constituer une population ressource particulièrement précieuse pour les études moléculaires sur ce caractère. Les études de génétique d'association et de recherche de signatures de sélection menées sur ce modèle sont en faveur d'un déterminisme polygénique du pHu mais soulignent dans le même temps le rôle majeur d'une région localisée sur le chromosome 1 (Le Bihan-Duval *et al.*, 2018). Localisé au sein de cette région et surexprimé chez les animaux pHu- par rapport aux animaux pHu+ (Beauclercq *et al.*, 2017), *PPP1R3A* constitue un gène candidat d'intérêt pour expliquer la variabilité de pHu. En effet, il code pour une sous-unité régulatrice d'une protéine phosphatase qui, comme l'AMPK, est impliquée dans l'équilibre énergétique cellulaire, en activant la GS et en inhibant la PYG. Ces premiers résultats ouvrent bien-sûr de nombreuses perspectives pour étudier l'effet de ce gène sur les réserves

énergétiques du muscle et la qualité de la viande du poulet, et rechercher les mutations impliquées.

### *1.3.1.2 Viande Dark, Firm and Dry (DFD)*

Les viandes DFD sont caractérisées par une couleur foncée (**Figure 6**), une texture ferme due à l'eau qui a tendance à rester associée aux fibres et à la faible dénaturation des protéines, ainsi qu'un pH élevé. Du fait de ce dernier, ces viandes sont plus prédisposées à une contamination microbienne, ce qui a un effet délétère sur la conservation du produit (Faucitano *et al.*, 2010 ; Traffano-Schiffo *et al.*, 2018). En plus de la contamination microbienne, la couleur foncée des viandes DFD est un autre facteur important. En effet, cela affecte également la couleur des produits transformés, et peut donc avoir un impact sur la décision d'achat des consommateurs (Traffano-Schiffo *et al.*, 2018). Toutefois, l'incidence des viandes DFD chez la volaille, mais également chez le porc, dépasse rarement 10%, ce qui reste plus faible que les viandes acides ou plus généralement PSE-like (Adzitey and Nurul, 2011).

Aucun gène majeur associé au développement des viandes DFD n'a été identifié chez le porc ou la volaille. Comme nous l'avons déjà évoqué, chez la volaille la sélection pour une augmentation de la croissance musculaire a indirectement conduit à une augmentation de pHu (*via* la réduction des réserves énergétiques musculaires), sans que les gènes ou voies métaboliques associés ne soient encore élucidés. La sélection directe pour augmenter (ou diminuer) le pHu s'avère aussi efficace : en 6 générations de sélection, il a été augmenté de près de 0,3 unité dans la lignée pHu+, qui présentait plus de 60% de viande de type DFD (pHu > 6.1) (Le Bihan-Duval *et al.*, 2018). Au-delà du facteur génétique, les viandes DFD peuvent être causées par un stress chronique prolongé induit par différents facteurs environnementaux, comme une longue période de transport, qui épuise le glycogène du muscle et entraîne une augmentation du pH. Les facteurs alimentaires favorisant la croissance musculaire, comme un régime enrichi en lysine, peuvent également induire une augmentation du pHu de la viande (Berri *et al.*, 2008 ; Guardia *et al.*, 2014).

### **1.3.2 Émergence de nouveaux défauts myopathiques**

L'ensemble des défauts précédemment décrits sont directement liés aux variations de pH de la viande et n'entraînent pas d'altérations majeures de la structure ou de la composition chimique du muscle (Alnahhas *et al.*, 2015). Ce n'est pas le cas des défauts qui vont être décrits dans cette partie et qui s'apparentent clairement à des myopathies.

### *1.3.2.1 Deep pectoral myopathy (DPM)*

Le défaut DPM (deep pectoral myopathy), aussi connu sous le nom de “green muscle disease” ou encore “Oregon disease”, a été décrit pour la première fois en 1968 chez la dinde comme une « myopathie dégénérative » (Dickinson *et al.*, 1968). Il est apparu chez les volailles (poulet et dinde) à croissance rapide depuis environ une trentaine d’années (Siller, 1985). D’abord décrit sur des viandes d’animaux adultes, le défaut DPM est devenu de plus en plus fréquent chez les poulets avec une vitesse de croissance rapide et un fort développement musculaire, ainsi que chez les individus mâles (Siller, 1985 ; Lien *et al.*, 2011).

Le défaut DPM se traduit par une nécrose ischémique qui se développe dans le muscle *Pectoralis minor* (P. minor ou aiguillette), donnant une couleur verte au muscle (**Figure 7**). L’étiologie de ce défaut n’est pas entièrement connue. Toutefois, le développement accru des muscles pectoraux chez les animaux lourds qui entraîne la compression du muscle P. minor par le muscle P. Major contre l’os du bréchet, a été mis en cause. En effet, l’augmentation de la pression sur le muscle entraîne l’occlusion des vaisseaux sanguins, causant l’apparition de lésions nécrotiques irréversibles au sein du muscle. La transformation de la couleur rouge en couleur verte est due au catabolisme de l’hémoglobine en biliverdine (Kijowski *et al.*, 2014). De plus, toutes les perturbations des conditions d’élevage provoquant une activité musculaire intense (accès éloignés à l’eau et à l’aliment, programme lumineux, activité humaine, bruits excessifs, comportements de fuite, battements d’ailes, etc.) vont favoriser le développement du défaut (Petracci and Cavani, 2012 ; Kijowski *et al.*, 2014). La prévalence du défaut DPM est différente selon les souches, indiquant que la génétique et probablement la conformation des animaux peuvent jouer un rôle dans le déterminisme de ce défaut (Petracci and Cavani, 2012).



**Figure 7** : Deep pectoral myopathy (DPM) (Kijowski and Konstanczak, 2009)

Ce type de lésion est généralement découvert lors de la découpe et peut affecter une, voire les deux aiguillettes. Bien que sans impact sur la santé humaine, le défaut DPM affecte fortement l'apparence du produit. Les filets atteints sont retirés de la carcasse, qui elle reste consommable. Toutefois, le parage peut entraîner des dommages sur les autres parties de la carcasse (filets notamment), ainsi que des pertes économiques pour l'industrie, puisque le défaut affecte les parties de la carcasse les mieux valorisées (Kijowski *et al.*, 2014).

Dans les abattoirs industriels italiens, la fréquence du défaut DPM a été estimée à 0,84% chez les poulets pesant plus de 3kg (Bianchi *et al.*, 2006), entre 0,02 et 1,90% dans les abattoirs polonais (Kijowski *et al.*, 2014) ou encore entre 3 et 17% au cours d'études expérimentales sur différentes souches aux USA (Lien *et al.*, 2011). En France, une enquête réalisée en 2017 dans plusieurs abattoirs industriels a montré une incidence des défauts DPM de 0,33%.

### *1.3.2.2 White striping (WS), Wooden Breast (WB) et Spaghetti Muscle (SM)*

Depuis une dizaine d'années, plusieurs défauts de qualité sont apparus, affectant l'intégrité et la composition des muscles, essentiellement au niveau du filet. Ces défauts modifient fortement l'aspect visuel des muscles pectoraux. La littérature est unanime pour dire que les lésions associées à ces défauts s'apparentent à des myopathies, sans que l'on ne connaisse encore leur origine génétique ou biologique. Les trois principaux défauts identifiés sont le white striping, le wooden breast et le muscle spaghetti (SM). De manière intéressante, il apparaît que même si les défauts WS et WB sont le plus souvent décrits chez les poulets à croissance rapide, ils ont également été observés chez des poulets à croissance plus lente, et chez d'autres espèces de volailles comme la caille et la dinde (Tasoniero *et al.*, 2016b ; Soglia *et al.*, 2018).

Les premières études concernant le défaut WS chez le poulet ont été publiées en 2009 (Bauermeister *et al.*, 2009 ; Kuttappan *et al.*, 2009). Ce défaut est caractérisé par la présence visible en surface de striations blanches, de taille variable, et parallèles à la direction des fibres musculaires (Bauermeister *et al.*, 2009 ; Kuttappan *et al.*, 2009 ; Kuttappan *et al.*, 2012c) (**Figure 8**).



**Figure 8** : Filets atteints de white striping sévère (UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture)

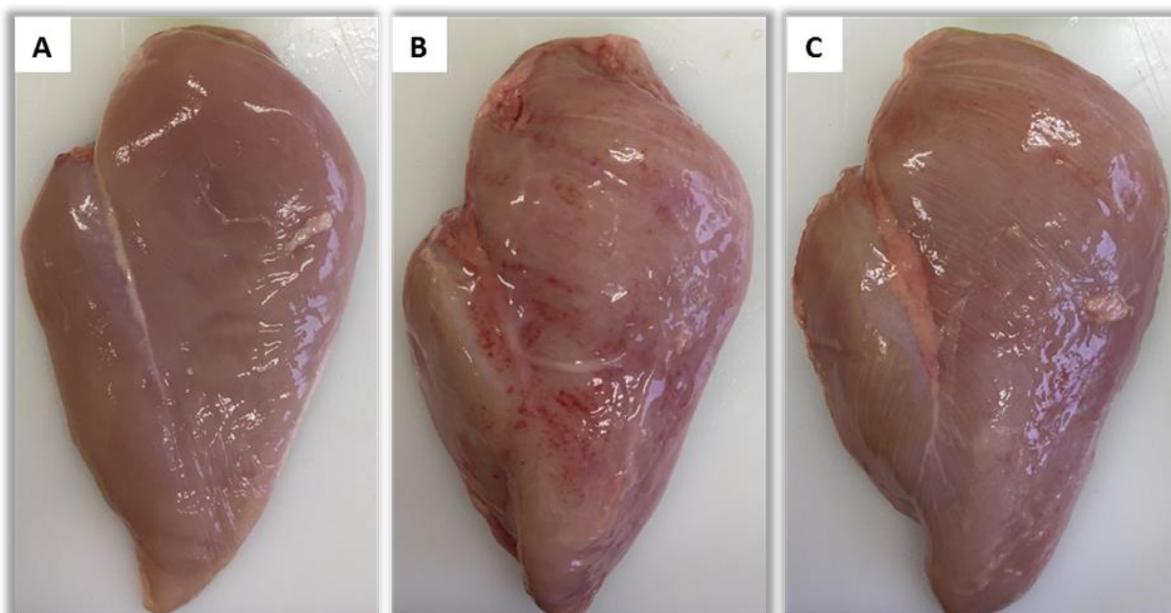
Ces striations se retrouvent principalement sur le filet (muscle *P. major*), mais elles peuvent parfois apparaître sur les cuisses (muscle *Sartorius*), les aiguillettes (muscle *P. minor*) et les pilons (muscle *Gastrocnemius*). Elles sont beaucoup plus distinctes sur le filet, au niveau de la partie crâniale de la face ventrale, proche du point d'attachement des ailes. Cependant, dans les cas les plus sévères de WS, elles peuvent être visibles tout le long du filet. Le sillon central situé sur la face externe du filet peut être également envahi par un large dépôt de graisse. Un classement des filets en 3 catégories a été mis en place selon leur degré de sévérité (normal, modéré, sévère), en se basant sur l'aspect visuel du filet (Kuttappan *et al.*, 2012c) (**Figure 9**).

L'identification du défaut WS ne peut être réalisée que post-mortem, lors de la découpe, et l'établissement du degré de gravité se fait par examen visuel des filets. Ces derniers sont considérés comme normaux en absence de stries blanches, modérément atteints s'il y a présence de stries blanches, facilement reconnaissables, avec une épaisseur inférieure à 1 millimètre, et sévèrement atteints si les striations sont très visibles et qu'elles sont supérieures à 1 millimètre d'épaisseur.



**Figure 9** : Classement des filets atteints de white striping (normal (A), modéré (B), sévère (C)) (Kuttappan et al., 2013c)

Le défaut WB, quant à lui, a été observé plus tardivement. En effet, la première étude portant sur le défaut WB est parue en 2013 (Sihvo *et al.*, 2013). Les filets présentant du WB sont caractérisés par une texture relativement dure sur des zones plus ou moins étendues (**Figure 10**). Ils apparaissent également plus bombés et plus pâles que les filets normaux (Sihvo *et al.*, 2013). Très souvent, les filets sont recouverts d'un liquide clair et visqueux et présentent des hémorragies mineures (pétéchies), et le tissu conjonctif externe fait des ondulations. Même si les filets peuvent présenter le défaut WB seul, il est souvent accompagné du défaut WS (**Figure 10 C**) (Soglia *et al.*, 2016b ; Kuttappan *et al.*, 2017b).



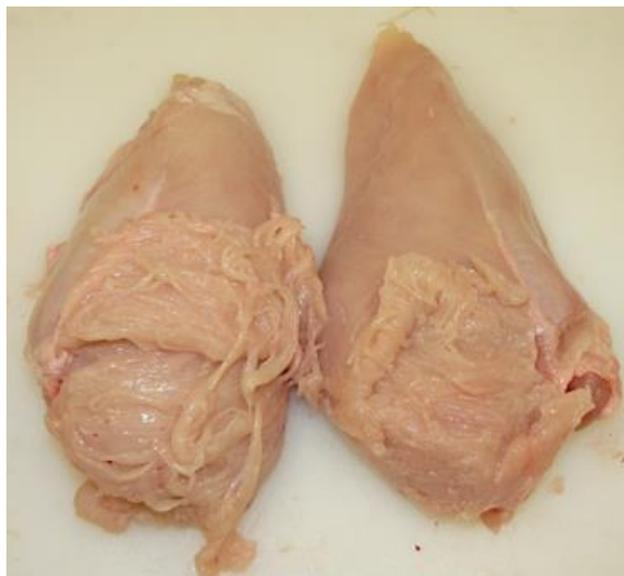
**Figure 10** : Filet normal (A), filet atteint de wooden breast sévère (B), filet atteint de white striping et de wooden breast (C) (UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture)



Tout comme le défaut WS, la classification des filets selon le degré de sévérité du défaut WB se fait principalement par observation visuelle et palpation du muscle. Selon les études, plusieurs classifications sont proposées, en trois ou quatre points (Sihvo *et al.*, 2016 ; Papah *et al.*, 2017). L'ITAVI a créé un référentiel visuel d'identification des défauts de carcasse, pour former les acteurs en abattoirs et maîtriser la qualité (ITAVI, 2017). Selon ce référentiel, les filets sont considérés comme normaux si les muscles sont tendres, souples au toucher, avec une coloration uniforme ; modérément atteints si les muscles sont plus volumineux, plus pâles, bombés et durs au toucher ; et sévèrement atteints si les muscles sont plus volumineux, bombés, extrêmement durs au toucher, avec apparition d'ondulations et de pétéchies dans les cas extrêmes.

De manière générale, les défauts WS et WB sont majoritairement détectés chez des animaux ayant atteint l'âge et le poids d'abattage. Cependant, il a été démontré que des lésions modérées de type WS et WB apparaissaient respectivement dès l'âge de 25 et 18 jours, traduisant une mise en place précoce des défauts WS et WB (Dalle Zotte *et al.*, 2015 ; Sihvo *et al.*, 2016).

Plus récemment, des situations extrêmes où la cohésion entre les fibres musculaires est détruite ont été observées (**Figure 11**). Les muscles atteints par ce défaut ont une structure si lâche que les faisceaux des fibres musculaires peuvent être retirés avec les doigts, conduisant à la dénomination de muscles « spaghetti » (Sirri *et al.*, 2016 ; Maiorano, 2017 ; Baldi *et al.*, 2018).



**Figure 11** : Muscles spaghetti (ITAVI)

Dans ces filets, la protéolyse post-mortem est très importante. Le tissu conjonctif situé autour des fibres musculaire (endomysium) et autour des faisceaux de fibres musculaires (périnysium) diminue progressivement, entraînant la formation de grands espaces intracellulaires ainsi que le désagrégement des faisceaux des fibres musculaires (Baldi *et al.*, 2018 ; Huang and Ahn, 2018). Souvent associé avec le défaut WS, le défaut SM partage les mêmes changements histopathologiques que les défauts WS et WB (Huang and Ahn, 2018).

Bien que l'information sur l'incidence de ces trois myopathies soit limitée et parfois contradictoire, on suppose que les filets de poulet présentant ces défauts apparaissent dans tous les pays où des souches à croissance rapide sont utilisées. Plusieurs études conduites par différents groupes de recherches en Europe, au Brésil et aux États-Unis mettent en évidence une augmentation très rapide de la fréquence de ces défauts en abattoir (**Tableaux 2 et 3**).

En effet, le WS concerne 50% des filets de poulet en Italie, en France, en Espagne et au Brésil, ceux présentant un degré de gravité élevé représentant environ 20% à 30% du total des muscles touchés. De plus, l'évaluation des filets de poulets âgés de 9 semaines aux États-Unis a révélé que plus de 98% présentaient des signes de WS (plus de 55% classés comme modérés et sévères) (Kuttappan *et al.*, 2017b). D'une manière générale, le pourcentage d'individus atteints par le défaut WS au sein d'une population a fortement augmenté, passant de 28% en moyenne en 2013-2014 (Kuttappan *et al.*, 2013a ; Petracci *et al.*, 2013 ; Ferreira *et al.*, 2014 ; Lorenzi *et al.*, 2014) à 76% en 2015-2016 (Bailey *et al.*, 2015 ; Dalle Zotte *et al.*, 2015 ; Russo *et al.*, 2015 ; Alnahhas *et al.*, 2016 ; Tijare *et al.*, 2016). De pair, la fréquence de filets atteints de WS sévère a augmenté de 4% en moyenne en 2013-2014 à 33% en 2015-2016.

**Tableau 2 : Incidence du défaut WS**

Références	Incidence (%)	Poids des animaux (kg)	Age des animaux (jours)	GMQ <sup>1</sup> (g/j)	Rendement filet (%)	Sexe des animaux
(Kuttappan <i>et al.</i> , 2013a)	TOT : 55,8 MOD : 47,5 SEV : 8,3	2,50	59-63	39-41*	-	Mâle et femelle
(Petracci <i>et al.</i> , 2013)	TOT : 12,0 MOD : 8,90 SEV : 3,10	2,75	45-54	51-61*	-	-
(Ferreira <i>et al.</i> , 2014)	TOT : 9,84 MOD : 7,38 SEV : 2,46	3,20	42	76*	-	Mâle
(Lorenzi <i>et al.</i> , 2014)	TOT : 33,9 MOD : 31,1 SEV : 2,80	2,70	48	56,4	-	Mâle
(Bailey <i>et al.</i> , 2015)	TOT : 49,6	2,33	42	53*	29,4	-
(Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2015)	TOT : 98,4 MOD : 36,8 SEV : 61,6	3,50	51	67,6	22,5	Mâle
(Russo <i>et al.</i> , 2015)	TOT : 82,5 MOD : 56,8 SEV : 25,7	3,60	55	65,9	-	Mâle
(Tijare <i>et al.</i> , 2016)	TOT : 96,1 MOD : 63,8 SEV : 32,3	3,97	61	65*	-	Mâle
(Alnahhas <i>et al.</i> , 2016)	TOT : 50,7 MOD : 36,7 SEV : 14,0	2,80	42	67*	20,9	Mâle et femelle

<sup>1</sup>Les GMQ estimés sont indiqués par un astérisque.

Les données concernant l'incidence du WB dans les abattoirs sont plus limitées (**Tableau 3**). En Italie, une enquête réalisée entre 2017 et 2018 sur 16 000 filets a classé 42% des échantillons comme étant modérément atteints par le WB et 18% comme étant sévèrement touchés (Petracci *et al.*, 2019). L'évaluation des filets de poulets âgés de 9 semaines aux États-Unis a révélé qu'environ 85% des échantillons présentaient le défaut WB (dont plus de 42% avec des degrés sévères ou très sévères) (Kuttappan *et al.*, 2017b).

Il convient de souligner que les critères de classification des défauts peuvent varier considérablement selon les enquêtes (Petracci *et al.*, 2015 ; Kuttappan *et al.*, 2016). Les fréquences reportées dans cette partie sont donc indicatives. Par ailleurs, elles reflètent la diversité des génétiques et des pratiques d'élevage (souche, âge, sexe, alimentation) utilisées en production de poulet de chair. Toutefois, on peut remarquer que la fréquence des défauts WS

et WB sévères est particulièrement élevée pour la production de mâles lourds (abattus à plus de 3,5 kg).

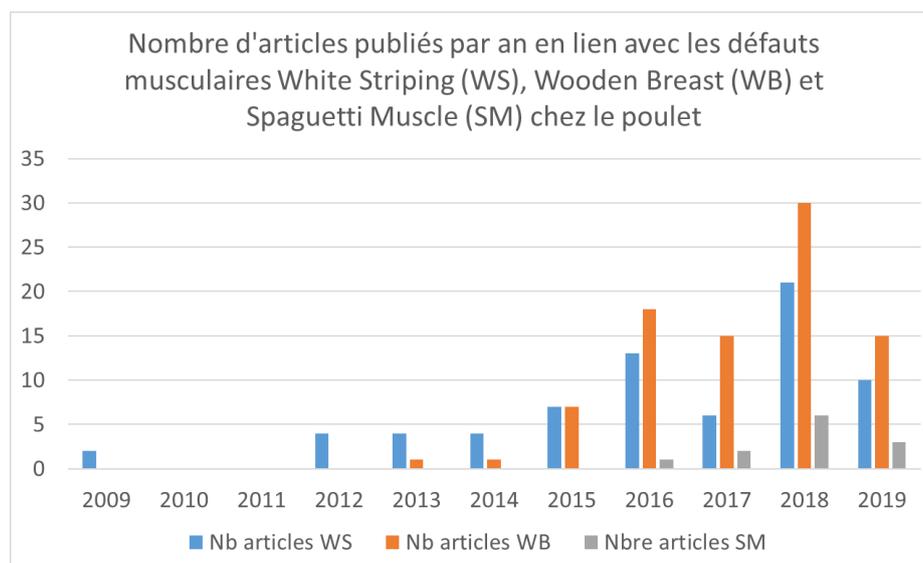
**Tableau 3** : Incidence du défaut WB

Références	Incidence (%)	Poids des animaux (kg)	Age des animaux (jours)	GMQ <sup>1</sup> (g/j)	Rendement filet (%)	Sexe des animaux
(Bailey <i>et al.</i> , 2015)	TOT : 3,19	2,33	42	53*	29,4	-
(Tijare <i>et al.</i> , 2016)	TOT : 96,0 MILD : 48 MOD : 28 SEV : 20	3,97	61	65*	-	Mâle
(Papah <i>et al.</i> , 2017)	TOT : 74,0 MILD : 40 MOD : 25 SEV : 9	2,70	42	61-70*	-	Mâle

<sup>1</sup>Les GMQ estimés sont indiqués par un astérisque.

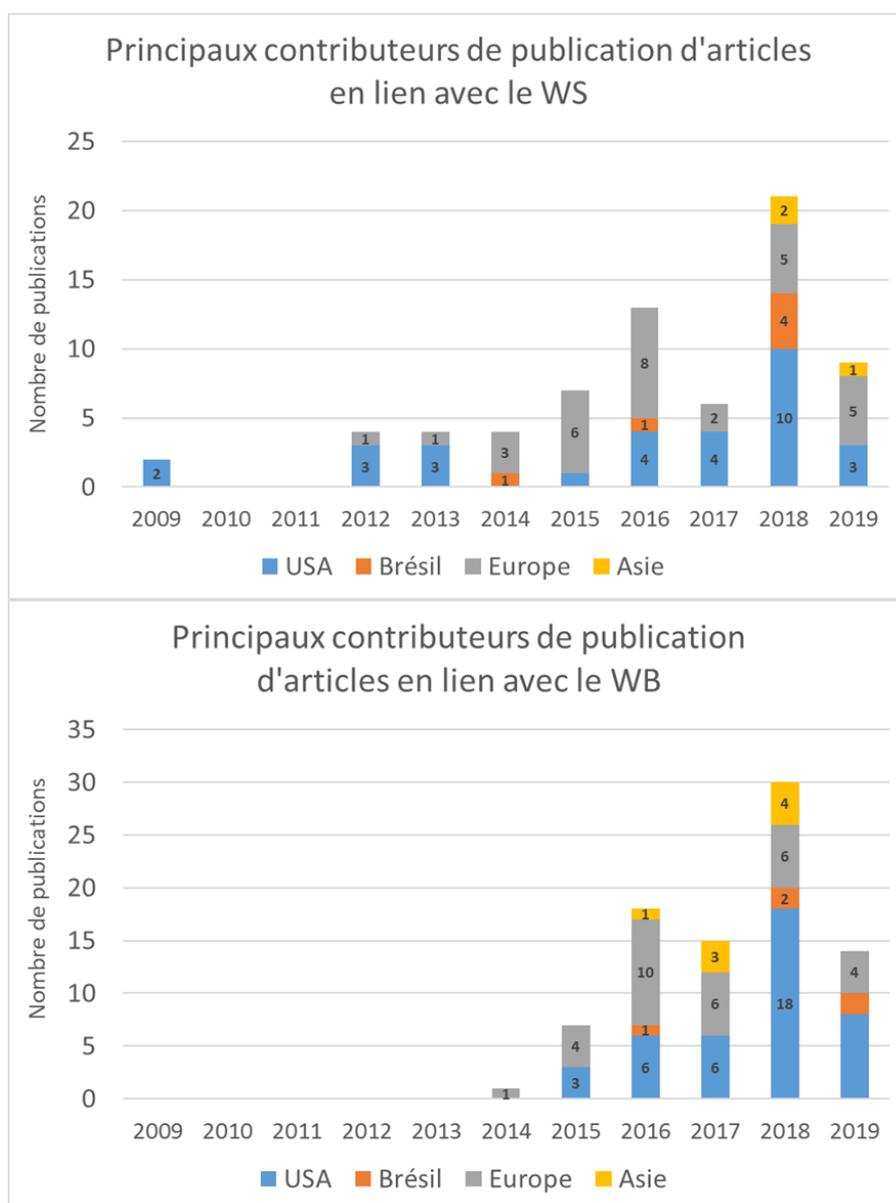
Peu de données sont actuellement disponibles concernant l'incidence des muscles spaghetti. En France, une enquête menée en 2017 dans les abattoirs industriels français a montré que 11% des filets présentaient le défaut sur 123 lots de poulets standards, certifiés et lourds (Baéza *et al.*, 2018).

L'augmentation progressive de l'incidence de ces trois défauts a entraîné une intensification des recherches autour de ces myopathies afin de déterminer leur origine génétique ou biologique. En témoigne l'augmentation croissante du nombre de publications scientifiques en lien avec les défauts WS et WB depuis leur apparition (**Figure 12**).



**Figure 12** : Nombre d'articles publiés par an en lien avec les défauts WS, WB et SM chez le poulet (jusqu'au 16/04/2019)

À partir de 2016, le nombre de publications concernant le WB dépasse celui concernant le WS, reflétant la chronologie d'apparition des défauts et le développement d'une problématique industrielle particulièrement critique dans le cas du WB. En effet, comme nous le verrons par la suite, dans les cas extrêmes les filets atteints de WB ne peuvent être ni vendus en frais, ni utilisés pour la transformation en produits élaborés. Les États-Unis sont les premiers producteurs mondiaux de volaille (22Mt), suivis de la Chine (16 Mt), de l'Union européenne (15 Mt) et du Brésil (14 Mt) (ITAVI, 2018). Il n'est donc pas étonnant que les États-Unis, l'Europe (essentiellement l'Italie, puis la France et la Finlande) et le Brésil soient les principaux contributeurs des publications en lien avec les défauts WS et WB chez le poulet (**Figure 13**).



**Figure 13** : Principaux pays contributeurs aux publications en lien avec les défauts WS et WB

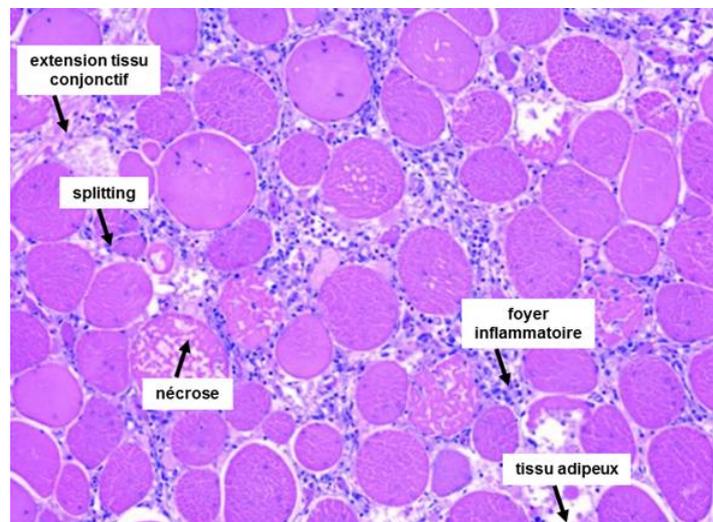
Les États-Unis ont été les premiers à publier sur le défaut WS avec les études de Bauermeister *et al.* (2009) et Kuttappan *et al.* (2009), rapidement suivis par l'Italie avec plusieurs articles de Petracchi *et al.* (2012, 2013, 2014, 2015) et Mudalal *et al.* (2014, 2015). Quant au défaut WB, c'est la Finlande avec l'étude de Sihvo *et al.* (2013) qui l'a décrit pour la première fois dans la littérature. Les premières publications sur les défauts se focalisaient essentiellement sur la description des lésions macroscopiques et microscopiques et l'impact de ces myopathies sur les paramètres de qualité de la viande. Progressivement, les articles se sont concentrés sur l'identification des facteurs de variation et des mécanismes moléculaires mis en jeu ainsi que sur la recherche et la mise en œuvre de différentes stratégies (génétique, alimentaire, conditions d'élevage) afin de prévenir ou limiter la fréquence et la sévérité des défauts. Enfin, plus récemment, plusieurs études ont proposé des méthodes de détection et de tri des filets atteints par les défauts directement au niveau de la chaîne de production. La suite de la synthèse bibliographique traite de ces différents sujets d'étude.

## II. Description des défauts « white striping » et « wooden breast »

Le projet de thèse s'est focalisé sur les deux principaux défauts musculaires présents dans les abattoirs français, le WS et le WB. Cette partie vise à faire une description exhaustive de ces défauts, des lésions histologiques observées aux caractéristiques sensorielles et technologiques altérées.

### II.1 Caractéristiques histologiques

Les défauts WS et WB ont largement été décrits dans la littérature. Le défaut WB étant régulièrement accompagné du défaut WS, il n'est pas surprenant de retrouver des caractéristiques histologiques communes entre les deux défauts (Sihvo *et al.*, 2013). Les observations histologiques des muscles atteints de WS et/ou de WB montrent des fibres en dégénérescence (nécrose), atrophiées, et de tailles variables (Kuttappan *et al.*, 2009 ; Kuttappan *et al.*, 2013c ; Sihvo *et al.*, 2013 ; Mazzoni *et al.*, 2015), ainsi que plusieurs autres changements fréquemment associés à des myopathies (**Figure 14**).



**Figure 14** : Coupe histologique de muscle atteint de WS, adapté de (Ferreira *et al.*, 2014)

Ces phénomènes sont accompagnés d'une lyse des fibres, d'une légère minéralisation, de signes de régénération (noyaux centraux) ainsi que d'une infiltration de cellules mononuclées (lymphocytes, macrophages) et une inflammation interstitielle (Kuttappan *et al.*, 2009 ; Kuttappan *et al.*, 2013c ; Sihvo *et al.*, 2013 ; Ferreira *et al.*, 2014 ; Petracci *et al.*, 2015 ; Russo *et al.*, 2015). Des phénomènes de fibrose (accumulation de tissus conjonctifs fibreux due à

l'endommagement du muscle, et remplacement des fibres musculaires avec des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) comme le collagène), et d'adipose (accumulation de tissus adipeux) sont observables dans les espaces intercellulaires. Les modifications histologiques observées dans les filets atteints de WS ou de WB sont clairement des signes d'une myopathie dégénérative.

Plus la sévérité des défauts augmente, plus on augmente la sévérité des lésions (nécrose notamment), et plus les phénomènes de fibrose et d'adipose sont importants. Ces inclusions de lipides et de collagène seraient la conséquence de nécrose de fibres musculaires. En effet, la dégénérescence des fibres dans des muscles endommagés libérerait de l'espace, favorisant l'expansion de collagène et l'accumulation de gras (Kuttappan *et al.*, 2012a). L'accumulation importante de tissu adipeux et dans une moindre mesure de collagène dans les muscles atteints de WS se traduirait par l'apparition de striations blanches à la surface du muscle (Petracci *et al.*, 2013). Dans les cas de WB sévère, les muscles présentent une extension très développée des tissus conjonctifs endomysium et pérимыsium (Sihvo *et al.*, 2013). Plusieurs études ont émis l'hypothèse que le collagène pourrait jouer un rôle majeur dans la définition de la fermeté accrue associée au développement du WB (Soglia *et al.*, 2017 ; Velleman *et al.*, 2017). Toutefois, il convient de souligner que d'après Sihvo *et al.* (2016), la fibrose ne serait pas la seule explication pour la fermeté des muscles WB. En effet, il semblerait que la fibrose soit une conséquence secondaire de la myodégénérescence chronique, puisque des muscles à consistance très dure et sans fibrose ont été observés dans les premières phases de développement du WB (Sihvo *et al.*, 2016).

L'observation histologique des muscles est un bon complément de la notation macroscopique des défauts pour juger de l'état lésionnel d'un muscle. En effet, plusieurs études ont montré que des filets notés visuellement 0 (i.e., normaux) présentaient des zones de nécrose, des fibres hypercontractées et des infiltrations de tissu adipeux et de cellules inflammatoires (Kuttappan *et al.*, 2013c ; Russo *et al.*, 2015 ; Trocino *et al.*, 2015 ; Sihvo *et al.*, 2016 ; Papah *et al.*, 2017). Trocino *et al.* (2015) ont également démontré que 97% des filets soumis à une analyse histologique présentaient des fibres endommagées, obtenant une corrélation de seulement 0,30 entre les évaluations visuelles et histologiques des défauts.

Les défauts WS et WB seraient histologiquement détectables autour de 14-15 jours (Radaelli *et al.*, 2016 ; Sihvo *et al.*, 2016), précédant les changements macroscopiques. Dans les premières phases de développement du WB, les lésions sont très localisées, puis s'étendent peu à peu pour former des lésions diffuses et sévères plus on approche de l'âge à l'abattage (Sihvo *et al.*, 2016).



## II.2 Caractéristiques hématologiques et sérologiques

Concernant les paramètres hématologiques (nombre de leucocytes, globules rouges, lymphocytes, hémoglobine, et hématocrite), aucune différence n'a été observée entre les muscles normaux ou atteints de WS, même au niveau du dénombrement des leucocytes. Ceci signifie qu'aucune condition inflammatoire ou infection généralisée n'est associée à du WS sévère (Kuttappan *et al.*, 2013b).

D'un point de vue sérologique, toutefois, quatre enzymes ont des concentrations élevées dans le sérum des animaux avec du WS sévère : la créatine kinase, l'alanine transaminase, l'aspartate aminotransférase et la lactate déshydrogénase, qui sont des marqueurs de nécrose tissulaire (Kuttappan *et al.*, 2013b). Ces niveaux élevés indiquent que l'intégrité du sarcolemme (i.e., la membrane plasmique des fibres musculaires) est perturbée et attestent de l'endommagement des tissus musculaires et de phénomènes dégénératifs similaires aux dystrophies musculaires telles que la maladie de Duchenne chez l'homme (dans cette pathologie les activités de la créatine kinase et de la lactate déshydrogénase sont augmentées).

De plus, les filets atteints de défauts WS et WB montrent une augmentation de certains minéraux comme le calcium, le fer et le sodium, et une diminution du potassium et du phosphore (Tasoniero *et al.*, 2016a). Une dérégulation de l'homéostasie des ions, et principalement de  $\text{Ca}^{2+}$ , peut avoir un rôle significatif dans le développement de lésions cellulaires. En effet, les dommages résultants de l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sur les cellules musculaires peuvent se produire de différentes manières. On suppose que l'excès de calcium peut entraîner une activation de protéases et de lipases intracellulaires qui viennent altérer l'intégrité de la membrane des fibres musculaires en dégradant les protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires, entraînant une nécrose des fibres qui potentiellement dépasse la capacité de régénération du muscle (Petracci *et al.*, 2015). L'activation de lipases et protéases permettrait également une augmentation de l'afflux de calcium, amorçant ainsi un "cercle vicieux" de lésions musculaires et de libération de calcium (Mutryn *et al.*, 2015).

## II.3 Caractéristiques technologiques

Les caractéristiques technologiques des muscles peuvent être définies au travers des performances de croissance (poids du filet, rendement en filet) ainsi qu'au travers des paramètres liés à la qualité de la viande (paramètres de couleur, pertes à la cuisson, tendreté,

exsudat, pHu). Le **Tableau 4** récapitule l'ensemble des caractéristiques des filets de poulet présentant le défaut WS et/ou WB.

**Tableau 4** : Propriétés fonctionnelles des filets atteints de WS seul, de WB seul ou des deux défauts par rapport aux filets normaux N

Paramètres	WS	WB	WS/WB	Références
Poids vif	> N	-	-	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2013b ; Alnahhas <i>et al.</i> , 2016)
Poids du filet	> N	> N	> N	(Bauermeister <i>et al.</i> , 2009 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013b ; Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2014 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2014 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015 ; Bowker and Zhuang, 2016 ; Chatterjee <i>et al.</i> , 2016 ; Sanchez Brambila <i>et al.</i> , 2016 ; Zambonelli <i>et al.</i> , 2016 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2017b ; Baldi <i>et al.</i> , 2018 ; Dalgaard <i>et al.</i> , 2018)
Rendement en filet	> N	> N	> N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013b ; Alnahhas <i>et al.</i> , 2016 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2017b)
L*	≥ N	≥ N	= N	(Bauermeister <i>et al.</i> , 2009 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013a ; Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015 ; Trocino <i>et al.</i> , 2015 ; Bowker and Zhuang, 2016 ; Chatterjee <i>et al.</i> , 2016 ; Sanchez Brambila <i>et al.</i> , 2016 ; Tasoniero <i>et al.</i> , 2016a ; Zambonelli <i>et al.</i> , 2016 ; Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2017 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2017b ; Wold <i>et al.</i> , 2017 ; Cai <i>et al.</i> , 2018 ; Zhuang and Bowker, 2018 ; Baldi <i>et al.</i> , 2019)
a*	≥ N	≥ N	≥ N	
b*	> N	> N	> N	
Résistance force de compression/cisaillement, filets crus ou marinés	≥ N	≥ N	> N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2013c ; Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015 ; Trocino <i>et al.</i> , 2015 ; Soglia <i>et al.</i> , 2016b ; Tasoniero <i>et al.</i> , 2016a ; Zambonelli <i>et al.</i> , 2016 ; Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2017 ; Cai <i>et al.</i> , 2018 ; Dalgaard <i>et al.</i> , 2018 ; Zhuang and Bowker, 2018 ; Baldi <i>et al.</i> , 2019)
Pertes à la cuisson, filets crus ou marinés	> N	> N	> N	(Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2014 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015 ; Trocino <i>et al.</i> , 2015 ; Tasoniero <i>et al.</i> , 2016a ; Tijare <i>et al.</i> , 2016 ; Zambonelli <i>et al.</i> , 2016 ; Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2017 ; Dalgaard <i>et al.</i> , 2018 ; Malila <i>et al.</i> , 2018)
Exsudat, filets crus ou marinés	≥ N	> N	> N	(Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2017b ; Cai <i>et al.</i> , 2018 ; Dalgaard <i>et al.</i> , 2018 ; Malila <i>et al.</i> , 2018)
Rendement technologique	< N	< N	< N	(Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015)
Assimilation d'une marinade	< N	< N	< N	(Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015 ; Tijare <i>et al.</i> , 2016)
pHu	≥ N	≥ N	> N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2013c ; Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Mudalal <i>et al.</i> , 2015 ; Trocino <i>et al.</i> , 2015 ; Alnahhas <i>et al.</i> , 2016 ; Bowker and Zhuang, 2016 ; Chatterjee <i>et al.</i> , 2016 ; Sanchez Brambila <i>et al.</i> , 2016 ; Soglia <i>et al.</i> , 2016b ; Tasoniero <i>et al.</i> , 2016a ; Zambonelli <i>et al.</i> , 2016 ; Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2017 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2017b ; Wold <i>et al.</i> , 2017 ; Baldi <i>et al.</i> , 2018 ; Cai <i>et al.</i> , 2018 ; Dalgaard <i>et al.</i> , 2018 ; Malila <i>et al.</i> , 2018 ; Zhuang and Bowker, 2018)

Les poids et rendements en filets sont variables selon les études puisqu'ils dépendent notamment du fond génétique, du sexe des animaux et du poids et de l'âge d'abattage. Globalement, il apparaît clairement que l'occurrence et la sévérité des défauts s'accroissent

avec l'augmentation du poids des animaux, ainsi que du poids et du rendement des filets (**Tableau 4**).

La couleur de la viande est déterminée par plusieurs facteurs (âge, sexe, technique de transformation, cuisson, état de contraction du muscle, etc.) dont la quantité de myoglobine, qui est une protéine sarcoplasmique servant de transporteur d'oxygène dans le muscle (Fletcher *et al.*, 2000). Plus l'animal est âgé, plus la concentration en myoglobine augmente et la chair devient rouge. Les fibres musculaires blanches qui composent les filets (fibres type II, glycolytiques, à contraction rapide) ont une faible teneur en myoglobine par rapport aux fibres musculaires rouges qui composent les cuisses ou les pilons (fibres de type I, oxydatives, à contraction lente) (Dransfield and Sosnicki, 1999). Les pigments xanthophylles, molécules de couleur jaune, peuvent également affecter les indices de jaune et de rouge du filet (Jlali *et al.*, 2012). La couleur peut être mesurée objectivement et de façon reproductible par colorimétrie avec des spectrophotomètres. Elle est définie au travers de trois composantes : la clarté ou luminance ( $L^*$ ), l'indice de rouge ( $a^*$ ) et l'indice de jaune ( $b^*$ ). Ces trois composantes sont considérablement modifiées avec la présence des défauts WS et WB (**Tableau 4**). Les premières études concernant l'impact des défauts sur les paramètres de qualité de la viande ne montrent pas de différence significative pour la composante  $L^*$  entre les filets normaux ou atteint de WS et WB (Bauermeister *et al.*, 2009 ; Kuttappan *et al.*, 2013a ; Petracci *et al.*, 2013). Toutefois, les dernières études indiquent clairement une augmentation de  $L^*$  avec la présence et la sévérité des défauts, notamment pour le WB qui confère à la viande une pâleur caractéristique (Mudalal *et al.*, 2015 ; Dalle Zotte *et al.*, 2017 ; Baldi *et al.*, 2019). En ce qui concerne l'indice de rouge, les filets présentant les défauts WS et WB ont tendance majoritairement à avoir un  $a^*$  plus élevé que les filets normaux, le changement étant déjà détectable à un degré modéré de lésions. L'hypothèse a été émise que la couleur plus rouge dans les filets lésés découlerait d'une surexpression de la myoglobine qui pourrait être concomitante au phénomène de commutation de type de fibres, à savoir la conversion de fibres de type II en fibres de type I en réponse au phénomène de nécrose des fibres (Mutryn *et al.*, 2015). Ce switch peut se produire suite à des phénomènes de nécrose et de dégénérescence des fibres, lors des mécanismes de réparation. La présence régulière de pétéchies, hémorragie mineure induite par la rupture d'un capillaire sanguin, à la surface des muscles atteints de WB peut également participer à l'augmentation de l'indice de rouge. L'indice de jaune ( $b^*$ ), quant à lui, augmente significativement avec la présence et la sévérité des défauts, donnant une couleur plus jaune aux muscles atteints par du WS ou du WB. Les pigments xanthophylles se trouvant dans les

grasses, on peut imputer cette modification de l'indice de jaune à un pourcentage plus élevé de graisse intramusculaire, ce qui donne aux filets une apparence plus grasse ou marbrée (Kuttappan *et al.*, 2012c ; Kuttappan *et al.*, 2013a).

Les méthodes de mesure physique de la texture de la viande font appel à des instruments qui tentent de simuler les sensations de toucher ressenties par le consommateur pendant la mastication, puis de les mesurer. Il s'agit de tests mécaniques qui mesurent la résistance ou l'amplitude de la déformation du produit à différents types de forces qui lui sont appliquées. Plusieurs mesures de forces mécaniques peuvent être réalisées ; la plus répandue consiste à mesurer la force nécessaire pour cisailer un échantillon de viande (généralement cuit) en faisant passer une arrête tranchante à travers un morceau de viande, perpendiculairement aux fibres musculaires. Même si certains cas de WB chez des poulets à l'âge de l'abattage ont été détectés macroscopiquement sans montrer une augmentation des dépôts de collagène (Sihvo *et al.*, 2013), la fibrose réparatrice est considérée jusqu'à présent comme la raison principale expliquant la consistance dure caractérisant les filets atteints de WB. En effet, une accumulation anormale de matrice extracellulaire et de ses composants (i.e., le collagène et les protéoglycanes) se produit généralement dans les tissus lésés, pouvant jouer un rôle dans la rigidité musculaire. Le collagène est la macromolécule fibreuse prédominante déposée dans l'épimysium et le pérимыsium, qui fournit au tissu musculaire une résistance mécanique à l'étirement, tandis que les protéoglycanes sont essentiels au maintien d'une structure normale des tissus ainsi que de leurs propriétés mécaniques. En ce qui concerne l'effet des myopathies sur la force de cisaillement de la viande cuite, il n'existe pas de consensus parmi les différentes études disponibles dans la littérature (**Tableau 4**). En effet, Mudalal *et al.* (2015) ont observé que les filets cuits atteints de WS, de WB ou des deux défauts à la fois n'étaient pas plus durs que les filets normaux, sauf si les filets étaient préalablement marinés. Dans ce cas-là, les filets présentant les deux défauts avaient une consistance plus dure que les filets normaux ou ayant un des deux défauts. En revanche, Petracci *et al.* (2013) ont rapporté des résultats différents. Dans cette étude, les filets atteints de WS sévère témoignaient même d'une consistance plus molle que celle obtenue après la cuisson d'une viande normale ou modérément affectée, la tendance étant toutefois inversée si les filets étaient préalablement marinés. Baldi *et al.* (2019) ont montré que la résistance à la force de cisaillement des filets affectés par le WS ou le WB était plus élevée sur filets crus, et à l'inverse plus faible sur filets cuits, par rapport aux filets normaux. Globalement, les mesures de tendreté suggèrent une augmentation de la résistance à la force de cisaillement en présence des défauts WS et WB sur filets crus qui n'est pas conservée

après cuisson. Ceci peut s'expliquer par le fait que les molécules de collagène sont composées de liaisons croisées thermiquement labiles et qui se solubilisent à des températures comprises entre 53 et 63° (Martens *et al.*, 1982). Néanmoins, la dureté des filets atteints de WB diminue au cours de la conservation à +4°C (Xiao and Owens, 2016b ; Sun *et al.*, 2018). La congélation-décongélation induit également une diminution de la dureté de ces filets (Xiao and Owens, 2016a).

Mise à part pour les mesures de tendreté, l'ensemble des études portant sur la qualité technologique des filets convergent. Elles montrent que les filets atteints de WS et/ou WB présentent un exsudat et des pertes à la cuisson supérieurs, une moins bonne assimilation de la marinade, ainsi qu'une diminution du rendement technologique par rapport aux filets normaux (**Tableau 4**). Ces observations indiquent une altération prononcée du PRE dans les filets affectés, qui est défini comme la capacité de la viande à retenir l'eau quand une force y est appliquée (i.e., découpe, pression, broyage) ou pendant la transformation de la viande (i.e., saumurage, cuisson) ou encore le stockage (Apple and Yancey, 2013).

La cinétique de baisse du pH post-mortem du muscle est également un déterminant majeur du PRE. Un pHu bas (plus proche du point isoélectrique des protéines musculaires, environ 5,0) conduit à la dénaturation des protéines et donc à un PRE médiocre, tandis que les muscles à pHu élevé présentent de meilleures capacités de rétention d'eau (Hamm, 1960). Néanmoins, les théories bien établies expliquant la relation entre le pHu et le PRE des viandes ne s'appliquent pas aux filets affectés par les myopathies WS et WB chez le poulet. En effet, le pHu des filets atteints de WS ou de WB est généralement supérieur de plusieurs décimales (0,2 à 0,4) à celui des filets normaux, alors que leur PRE, lui, est bien inférieur. La dégénérescence sévère du tissu musculaire, notamment la diminution des protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques (Petracci *et al.*, 2014) observée dans ces myopathies, expliquerait le faible PRE de ces filets et l'absence de lien avec le pH (Dalgaard *et al.*, 2018). L'accumulation de matière interstitielle telle que l'eau, le collagène et les protéoglycanes dans les muscles WS et WB peut également contribuer à expliquer les pertes d'eau lors de la compression ou bien encore la cuisson.

Il convient de noter que, par rapport au WS, la présence de WB ou des deux défauts au sein du même filet accentue nettement la dégradation du PRE du muscle. Les observations sur la viande crue indiquent clairement que le défaut WB entraîne des effets indésirables plus graves sur les paramètres de qualité de la viande par rapport au WS. Sur la base de leurs observations histopathologiques, Kuttappan *et al.* (2009) et Sihvo *et al.* (2013) ont émis l'hypothèse que les

défauts WS et WB pourraient avoir une seule et même étiologie, et que dans cette hypothèse, le défaut WB pourrait correspondre à un stade avancé du développement de la myopathie.

## II.4 Composition chimique et valeur nutritionnelle

Les muscles du filet affectés par une ou deux myopathies (WS et WB) présentent des différences de composition chimique et nutritionnelle par rapport aux filets normaux chez le poulet (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : Caractéristiques chimiques et nutritionnelles des filets atteints de WS seul, de WB seul ou des deux défauts par rapport aux filets normaux N

Paramètres	WS	WB	WS/WB	Références
<b>Protéines totales</b>	< N	< N	< N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013c ; Mudalal <i>et al.</i> , 2014 ; Petracci <i>et al.</i> , 2014 ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a ; Soglia <i>et al.</i> , 2016b ; Wold <i>et al.</i> , 2017 ; Cai <i>et al.</i> , 2018 ; Malila <i>et al.</i> , 2018 ; Baldi <i>et al.</i> , 2019 ; Wold <i>et al.</i> , 2019)
<b>Protéines sarcoplasmiques</b>	≤ N	≤ N	≤ N	(Mudalal <i>et al.</i> , 2014 ; Petracci <i>et al.</i> , 2014 ; Baldi <i>et al.</i> , 2018)
<b>Protéines myofibrillaires</b>	≤ N	≤ N	≤ N	(Mudalal <i>et al.</i> , 2014 ; Petracci <i>et al.</i> , 2014 ; Baldi <i>et al.</i> , 2018)
<b>Collagène</b>	≥ N	≥ N	≥ N	(Mudalal <i>et al.</i> , 2014 ; Petracci <i>et al.</i> , 2014 ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a ; Soglia <i>et al.</i> , 2016b ; Baldi <i>et al.</i> , 2018 ; Cai <i>et al.</i> , 2018 ; Malila <i>et al.</i> , 2018 ; Baldi <i>et al.</i> , 2019)
<b>Lipides</b>	> N	> N	> N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013c ; Petracci <i>et al.</i> , 2014 ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a ; Soglia <i>et al.</i> , 2016b ; Wold <i>et al.</i> , 2017 ; Baldi <i>et al.</i> , 2018 ; Cai <i>et al.</i> , 2018 ; Baldi <i>et al.</i> , 2019)
<b>Gras intramusculaire</b>	> N	-	-	(Mudalal <i>et al.</i> , 2014 ; Petracci <i>et al.</i> , 2014 ; Alnahhas <i>et al.</i> , 2016)
<b>Humidité</b>	≥ N	> N	> N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Mudalal <i>et al.</i> , 2014 ; Petracci <i>et al.</i> , 2014 ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a ; Soglia <i>et al.</i> , 2016b ; Wold <i>et al.</i> , 2017 ; Baldi <i>et al.</i> , 2018 ; Cai <i>et al.</i> , 2018)
<b>AG polyinsaturés</b>	≤ N	= N	= N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013b ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a)
<b>AG monoinsaturés</b>	≥ N	= N	= N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013b ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a)
<b>AG saturés</b>	< N	= N	= N	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013b ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a)
<b>TBA-RS</b>	= N	> N	= N	(Alnahhas <i>et al.</i> , 2016 ; Soglia <i>et al.</i> , 2016a)

Les filets atteints de WS présentent un taux de protéines plus faible que les filets normaux. Mudalal *et al.* (2014) indiquent qu'il y a une diminution de la qualité des protéines dans les muscles atteints par rapport aux muscles normaux du fait de l'augmentation de la teneur en collagène et de la modification du profil des protéines sarcoplasmiques (protéines solubles,

majoritairement des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique) et myofibrillaires (protéines contractiles comme l'actine et la myosine par exemple). En effet, ils constatent une diminution de certaines protéines myofibrillaires (comme l'actine 42kDa, les chaînes légères de myosine à contraction lente LC1 et à contraction rapide LC3) et de quasiment toutes les protéines sarcoplasmiques (glycogène phosphorylase, pyruvate kinase, phosphoglucose isomérase, émolase, aldolase, glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, lactate déshydrogénase, et phosphoglycérate mutase). Une altération du système enzymatique peut être interprétée comme le signe d'une altération de la capacité du tissu musculaire à satisfaire sa demande en énergie dans des conditions pathologiques (Sihvo *et al.*, 2013 ; Mudalal *et al.*, 2014). De plus, la solubilité des protéines est également diminuée. Or, la solubilité des protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques est fortement corrélée avec le pouvoir de rétention d'eau de la viande. Elle a donc un rôle majeur dans les propriétés technologiques de la viande car une faible solubilité des protéines entraîne une altération de leurs propriétés fonctionnelles.

Les filets atteints de WS présentent également des teneurs en lipides et en gras intramusculaire supérieures aux filets normaux. En revanche, Alnahhas *et al.* (2016) et Soglia *et al.* (2016a) n'ont pas montré d'effet du WS sur l'indice TBA-RS (indice de peroxydation lipidique), que le filet soit modérément ou sévèrement affecté. Ceci suggère que, bien que la teneur en lipides soit généralement plus élevée dans les filets atteints de WS, ils ne seraient pas plus susceptibles à l'oxydation que les filets normaux. De plus, dans la majorité des cas, des niveaux plus élevés d'acides gras monoinsaturés et des taux plus bas d'acides gras saturés et polyinsaturés ont été observés chez les filets de poulet présentant du WS sévère par rapport aux filets sains. Une quantité élevée d'acides gras monoinsaturés dans le muscle pourrait être le marqueur d'une lipogenèse et donc d'un engraissement accru au niveau musculaire.

Des résultats similaires ont été observés dans les filets atteints de WB (avec ou sans WS). L'ensemble des études ont rapporté des résultats convergents, notamment une réduction significative des teneurs en protéines et une augmentation des taux d'humidité et de lipides dans les muscles WB par rapport aux muscles sains. Cependant, Soglia *et al.* (2016b) ont souligné que, contrairement aux filets WS, les filets WB et WS/WB ne présentaient aucune différence en acides gras saturés, monoinsaturés, et polyinsaturés par rapport aux muscles normaux.

Les modifications de la composition chimique des viandes WS, WB et WS/WB sont cohérentes avec les observations histopathologiques de ces muscles (i.e., dégénérescence et lyse des fibres musculaires, légère minéralisation, régénération occasionnelle, infiltration de cellules mononuclées, adipeuse, inflammation et fibrose interstitielle). Ces modifications sont cohérentes

avec la diminution de la teneur en protéines totales qui est un effet indirect de la dégénérescence des fibres musculaires et de l'accumulation accrue de lipides intramusculaires et de tissu fibreux. L'augmentation de lipides, de gras intramusculaire et de collagène dans les muscles atteints de WS et WB est due aux phénomènes de réparation du muscle : l'adipose et la fibrose. De manière intéressante, Soglia *et al.* (2018) ont noté que le défaut WS n'affecte que légèrement la composition de la viande de dinde (lipides et cendres) par rapport à celle de poulet. On peut alors supposer qu'il existe une réponse physiologique spécifique de l'espèce vis-à-vis des profonds changements induits par la sélection génétique sur le développement musculaire.

Dans cette partie, nous avons répertorié un nombre important de modifications structurales, fonctionnelles et biochimiques des muscles présentant les défauts WS et WB qui, nous le verrons dans la partie suivante, ne sont pas sans conséquences pour la filière et les consommateurs.



### **III. Impact des défauts WS et WB pour la filière et les consommateurs**

Au cours des 20 dernières années, la pression génétique visant à améliorer le taux de croissance et le rendement en filet des poulets a entraîné une incidence plus élevée des anomalies musculaires avec une recrudescence des défauts, tels que le WS et le WB. En abattoir français, bien que les pratiques diffèrent d'un abattoir à l'autre, seuls les filets les plus gravement touchés sont globalement déclassés. Dernièrement, certaines directions départementales de la protection des populations (DDPP) ont commencé à faire des retraits sanitaires sur les filets atteints de WS et de WB, mais la pratique est loin d'être généralisée. L'impact de ces défauts sur la rentabilité économique de la filière reste donc faible, mais risque de progresser à moyen terme si la fréquence et la sévérité des défauts ne cessent d'augmenter. De plus, les qualités nutritionnelle, sensorielle et technologique de la viande étant dégradées, ces défauts impactent la satisfaction du consommateur et potentiellement sa motivation à acheter de la viande de volaille. Enfin, il ne faut pas négliger l'impact sur l'image de la filière dans un contexte marqué par des attentes sociétales fortes sur la santé et le bien-être des animaux.

#### **III.1 Rejet par les consommateurs**

Les consommateurs sont de plus en plus exigeants en termes de sécurité, de propriétés sensorielles, de valeur nutritionnelle et de bien-être des animaux (Magdelaine *et al.*, 2008 ; Lusk, 2018). L'impact négatif des défauts WS et WB sur l'apparence des filets frais (décoloration, pétéchies, stries blanches anormales, renflements) peut être une motivation suffisante pour que le consommateur rejette les produits atteints par une myopathie. En effet, la couleur de la viande et l'aspect général du produit, quelle que soit l'espèce animale considérée, sont les principaux critères ayant une influence sur la perception de qualité d'un produit par les consommateurs. En effet, ils se basent sur la couleur et l'apparence pour juger de la fraîcheur d'un produit dans une barquette filmée et sont, dans la majorité des cas, prêts à payer un prix plus élevé pour un produit ayant une couleur qu'ils jugent acceptable. Par conséquent, toute condition affectant négativement l'apparence visuelle d'un produit peut influencer sur la décision d'achat de viande crue et conditionnée, entraînant potentiellement des pertes économiques.

L'étude la plus complète sur l'attitude des consommateurs à l'égard des filets de poulet atteints de myopathies a été réalisée par Kuttappan *et al.* (2012b). Plusieurs photos de filets atteints par

différents degrés de sévérité du défaut WS ont été présentées à des consommateurs américains. Dans une évaluation hédonique de l'apparence globale des filets, sur une échelle de 9 points, le score des consommateurs diminuait de manière significative avec l'augmentation de la sévérité de la myopathie (filets normaux : 6,9, filets avec WS modéré : 6,5 et filets avec WS sévère : 4,5). Dans l'ensemble, plus de la moitié des consommateurs (56,7%) n'ont pas apprécié les filets présentant du WS sévère et ne les achèteront pas ou probablement pas. L'intention d'achat moyenne a donc également diminué de manière significative, passant de 3,6 pour un filet normal à environ 2,5 pour un filet atteint de WS, sur une échelle de 5 points. Lorsqu'on leur a demandé d'expliquer les raisons de leurs préférences, les consommateurs ont indiqué ne pas apprécier l'aspect plus gras du filet et la présence de stries blanches, perçues comme anormales dans un filet de poulet. Dalle Zotte *et al.* (2017) ont également fait une étude pour évaluer la qualité perçue par les consommateurs sur des produits présentant du WB. Selon cette étude, le WB dégrade la qualité du produit en ayant un impact direct sur l'apparence visuelle des filets par l'apparition de renflements, de pétéchies et d'exsudat en surface. Ces deux études indiquent que les défauts WS et WB ont un impact négatif sur l'apparence visuelle des filets, affectent la décision d'achat, entraînent le rejet du produit par les consommateurs et peuvent donc potentiellement entraîner des pertes économiques considérables pour la filière. En effet, le produit est difficilement vendable en frais. De plus, même s'il y avait acte d'achat par les consommateurs, Zhuang et Bowker (2018) ont montré qu'une fois le produit cuit, la partie ventrale du filet atteint de WB présentait des zones décolorées, et était plus foncée, plus rouge, et plus jaune, que des filets normaux. Or, les viandes de poulets cuisinées dont la couleur diffère de la couleur normale de la viande cuite entraînent le rejet des consommateurs (Fletcher, 1999). Tasoniero *et al.* (2016) ont suggéré un traitement de pré-cuisson pour qu'une fois les filets cuits, les défauts ne soient plus distinguables. Bien que cela ait été efficacement réalisé, une évaluation hédonique ultérieure a révélé que les filets WS/WB recevaient des scores inférieurs à ceux des filets normaux en raison de la sensation de goût en bouche. Or, la décision de rachat se fait en fonction de la qualité du produit exprimée au niveau de la texture, du goût et de la tendreté. Plusieurs analyses sensorielles ont montré que les filets atteints de WS ou de WB étaient plus durs, plus difficiles à mâcher, plus fibreux et plus cohésifs que les filets normaux (Sanchez Brambila *et al.*, 2016 ; Tasoniero *et al.*, 2016a ; Brambila *et al.*, 2018 ; Maxwell *et al.*, 2018).

De plus, la prise de conscience des causes sous-jacentes de ces viandes altérées et l'identification de ce produit en tant que « muscle malade » peuvent accentuer le rejet du

consommateur et dégrader l'image de la filière volaille. Ainsi, de plus en plus d'articles dédiés aux défauts WS et WB sont relayés par la presse spécialisée et généraliste, notamment par les médias de renommée internationale (CBSNews, 2016 ; TheWallStreetJournal, 2016 ; TheIndependent, 2017 ; TheSun, 2017). « Pourquoi vous devriez arrêter de manger des filets de poulet avec des stries blanches » titrait The Independent en février 2017, ou encore « Voilà ce que sont vraiment les stries blanches sur votre poulet, et pourquoi vous devez faire attention à elles », article publié dans The Sun en décembre 2017. La plupart de ces articles informent de la survenue des défauts WS et WB, de leurs causes et de leurs conséquences. Même si les informations divulguées sont parfois biaisées et pas totalement fondées sur le plan scientifique, il est un fait que les consommateurs des pays développés sont de plus en plus préoccupés par la manière dont les animaux sont élevés et la viande produite. Plusieurs études récentes ont montré que le défaut WB avait un impact négatif sur l'activité, la santé et le bien-être des animaux, diminuant leur qualité de vie (Papah *et al.*, 2017 ; Norring *et al.*, 2018 ; Severyn *et al.*, 2019). Les animaux atteints de WB ont une plus grande difficulté de locomotion et sont moins actifs (Norrning *et al.*, 2018). Certains animaux sont également incapables de se relever une fois en position décubitus dorsal (Papah *et al.*, 2017). De plus, des pathologies similaires sont fréquemment associées à des épisodes douloureux chez l'homme (Zebracki and Drotar, 2008), et on ne peut pas exclure que les animaux ressentent des douleurs similaires.

### **III.2 Altération des propriétés nutritionnelles et technologiques**

Compte tenu du rejet par les consommateurs des filets atteints de WS et WB, les détaillants peuvent difficilement vendre le produit en frais. Pour cette raison, l'abatteur dégrade ou retire de la chaîne les filets affectés par les défauts WS et WB en fonction de la gravité des défauts, ce qui peut se traduire par des pertes économiques. De manière générale, les filets atteints de WS sévère sont rétrogradés en minerai pour la transformation en produits élaborés (nuggets, charcuterie, etc.) où la composition chimique peut être modifiée durant la formulation (Lorenzi *et al.*, 2014). Les filets avec du WS modéré sont vendus en frais et ceux avec du WB sévère sont éliminés de la chaîne et déclassés pour la production de « pet food ». En plus des pertes économiques associées au retrait des produits, une part variable des filets acceptés pour la consommation humaine doit également être prise en compte pour évaluer l'impact économique de ces myopathies sur la filière. En effet, il faut prendre en compte dans ce calcul les pertes économiques dues i) au rejet par le consommateur en raison des propriétés visuelles et sensorielles indésirables, ii) à la condamnation ou au parage (filets entiers, carcasse), iii) au tri

manuel sur la chaîne de désossage (ajout et formation de personnel pour la classification et le tri), iv) à l'ajout d'additifs ou de traitements spéciaux lors de la transformation, et v) à la dégradation des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des filets.

La transformation des filets WS et WB en produits élaborés constitue une alternative pour commercialiser les filets atteints en éliminant le problème esthétique des défauts, et évite ainsi un rejet potentiel par le consommateur. Toutefois, plusieurs études ont montré que les filets WS et WB ont des propriétés technologiques inférieures, conséquence de l'altération du PRE des filets affectés, comme en témoigne l'augmentation des pertes à la cuisson et la moins bonne assimilation de la marinade, ainsi qu'une texture médiocre (Cf. II.3), affectant la qualité des produits transformés. Des additifs sont alors ajoutés, ou des traitements spéciaux au niveau des procédés de cuisson sont réalisés, augmentant le temps de travail, le coût à la transformation, et donc entraînant la diminution des marges (Lesiów and Kijowski, 2003). De plus, l'industrie de la transformation est aujourd'hui engagée dans une démarche de réduction des additifs, notamment pour les gammes de produits de qualité supérieure, et est donc particulièrement pénalisée par cette dégradation de la matière première associée aux défauts structuraux. La dégradation des propriétés fonctionnelles des filets atteints diminue en particulier le rendement technologique, préjudiciable pour les transformateurs. En effet, la composition en protéines a un impact crucial sur la transformation, la qualité sensorielle et nutritionnelle de la viande et des produits carnés. Les protéines de la viande contiennent tous les acides aminés essentiels pour le corps humain, et contribuent à la facilité de transformation, l'apparence, la texture, et le goût en bouche de la viande. Les processus biochimiques affectant la composition et l'intégrité des protéines (comme c'est le cas dans les filets WS et WB) peuvent alors altérer les propriétés technologiques des viandes.

En plus d'une diminution de la teneur en protéines, la teneur en lipides est également modifiée dans les muscles WS et WB, modifiant de manière significative leurs caractéristiques nutritionnelles (Cf. II.4). Les filets modérément ou sévèrement atteints ont de plus fortes teneurs en lipides par rapport aux filets normaux. Les filets affectés présentent une augmentation du ratio collagène sur protéines totales, indiquant une diminution de la valeur nutritionnelle en raison de la faible digestibilité du collagène et la carence en certains acides aminés essentiels contenus dans les protéines des fibres musculaires (Mudalal *et al.*, 2014 ; Petracci *et al.*, 2014). Or, l'atout du filet de poulet comparé à la viande de porc ou de bœuf repose largement sur son profil nutritionnel sain (faible teneur en cholestérol et teneurs élevées en protéines et acides gras polyinsaturés). En effet, la viande de poulet, et en particulier celle du filet, correspond à la

demande des consommateurs en matière de faible teneur en matières grasses, sodium et cholestérol et d'apport d'acides gras insaturés (Cavani *et al.*, 2009). La viande de volaille peut également être considérée comme un aliment fonctionnel, car elle fournit des substances bioactives ayant des effets favorables sur la santé humaine, telles que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (oméga 3), l'acide linoléique conjugué, les peptides bioactifs, les vitamines et les antioxydants (Cavani *et al.*, 2009).

En conclusion, en altérant la rentabilité économique, la qualité des produits et l'image de la production, les défauts WS et WB sont devenus un sujet majeur pour la durabilité de la production de viande de poulet. Au seul niveau économique, Kuttappan *et al.* (2016) estimaient entre 200 millions et 1 milliard de dollars par an le coût des myopathies WS et WB et ceux, uniquement aux États-Unis. Une autre étude estimait, en se basant sur 260000 animaux abattus par jour et 0,8% des filets exclus, à 70000 dollars les pertes par jour (Zanetti *et al.*, 2018). L'évolution de la littérature scientifique montre que la problématique du bien-être animal en lien avec l'éthique de la production devrait encore accentuer l'impact négatif de tels défauts sur la consommation de viande de poulet, en particulier dans les pays occidentaux.

## IV. Facteurs de variation

Compte tenu de l'augmentation rapide de la fréquence et de la sévérité des défauts dans les abattoirs, un grand nombre d'études a été mené ces dernières années pour mieux comprendre quels sont les principaux facteurs à l'origine de leur apparition. Les études ont considéré des facteurs liés aux caractéristiques intrinsèques des animaux, mais aussi à leur alimentation ou encore leur mode de production. Les objectifs de ces études étaient d'une part de mieux cerner les facteurs prédisposant à l'apparition de ces défauts mais aussi de rechercher des stratégies susceptibles de réduire leur fréquence et leur sévérité. Ce paragraphe propose de faire une synthèse de l'état actuel des connaissances dans ces domaines.

### IV.1 Caractéristiques de croissance des animaux et facteurs génétiques

Il est largement admis aujourd'hui que l'incidence des défauts musculaires WS et WB augmente avec l'amélioration des performances des animaux (augmentation du taux de croissance, poids et rendement en filet élevés à l'abattage) (Kuttappan *et al.*, 2012a ; Kuttappan *et al.*, 2013a ; Kuttappan *et al.*, 2013c ; Petracci *et al.*, 2013 ; Sihvo *et al.*, 2013 ; Lorenzi *et al.*, 2014). Le rôle de facteurs modifiant le poids et la composition corporelle des animaux à l'abattage (génotype, taux de croissance plus ou moins rapide, âge, et sexe) sur l'apparition et la sévérité des myopathies a été évalué au travers de plusieurs études chez des poulets à croissance rapide (**Tableau 6**). Les mâles ayant de meilleures performances que les femelles, le sexe des animaux est supposé influencer sur l'apparition des myopathies. C'est ce qui a été observé pour le WB, les poulets de chair mâles présentant des incidences de WB plus élevées que les femelles (16,3 vs 8,0%, respectivement) (Trocino *et al.*, 2015). Cependant, différents scénarios ont été décrits pour le WS. En effet, Trocino *et al.* (2015) n'ont détecté aucune différence entre les pourcentages totaux, modérés et sévères de WS entre les deux sexes. Les conclusions de Lorenzi *et al.* (2014) étaient en partie différentes puisqu'au sein d'un même génotype, les mâles présentaient un plus grand pourcentage de WS modéré que les femelles (31,1% vs 21,1%, respectivement), alors que le pourcentage de muscles sévèrement atteints était similaire entre les deux sexes (2,7%).

L'impact de la croissance sur l'incidence des défauts a également été confirmé par des observations histologiques montrant que la progression de la myodégénérescence associée à l'apparition des défauts musculaires est liée à l'âge au moment de l'abattage (Radaelli *et al.*,

2016 ; Sihvo *et al.*, 2016 ; Papah *et al.*, 2017 ; Griffin *et al.*, 2018 ; Kawasaki *et al.*, 2018) et au rendement en filet (Radaelli *et al.*, 2016 ; Papah *et al.*, 2017). Dernièrement, on a également émis l'hypothèse que le défaut WS serait une phase précoce du défaut WB et qu'il y aurait donc une progression du WS vers le WB avec l'augmentation de l'âge à l'abattage, qui influe à la fois sur le poids et le rendement en filet (Griffin *et al.*, 2018). Une limite physiologique aurait été atteinte, comme cela a pu être observé il y a une vingtaine d'années chez des dindes lourdes, qui présentaient au niveau de leurs muscles des lésions dégénératives accompagnées de nécrose (Sosnicki *et al.*, 1989).

**Tableau 6** : Facteurs d'élevage influençant l'apparition des défauts WS et WB dans les muscles du filet (adapté de Petracci *et al.*, 2019)

Facteurs	Effet sur l'apparition des défauts WS et WB	Références
<b>Souche</b>	A fort rendement musculaire > Standard	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2013a ; Petracci <i>et al.</i> , 2013 ; Lorenzi <i>et al.</i> , 2014 ; Bailey <i>et al.</i> , 2015 ; Trocino <i>et al.</i> , 2015 ; Griffin <i>et al.</i> , 2018 ; Livingston <i>et al.</i> , 2019a)
<b>Sexe</b>	Mâle > Femelle	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2009 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013a ; Lorenzi <i>et al.</i> , 2014 ; Trocino <i>et al.</i> , 2015)
<b>Age et poids des animaux à l'abattage</b>	Élevé > Bas	(Bauermeister <i>et al.</i> , 2009 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013b ; Lorenzi <i>et al.</i> , 2014 ; Russo <i>et al.</i> , 2015 ; Cruz <i>et al.</i> , 2016 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2017b ; Papah <i>et al.</i> , 2017)
<b>Croissance</b>	Très rapide > rapide	(Kuttappan <i>et al.</i> , 2012a ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2013c ; Lorenzi <i>et al.</i> , 2014 ; Kuttappan <i>et al.</i> , 2017b)

Dans la littérature, il n'y a pas de consensus sur l'implication de la génétique dans l'apparition des défauts WS et WB, si ce n'est au travers de son effet sur les variations de croissance et de développement musculaire des animaux. De nombreuses études ont suggéré que le génotype du poulet pourrait favoriser l'apparition des myopathies (Kuttappan *et al.*, 2013a ; Petracci *et al.*, 2013 ; Sihvo *et al.*, 2013 ; Lorenzi *et al.*, 2014 ; Trocino *et al.*, 2015 ; Griffin *et al.*, 2018 ; Livingston *et al.*, 2019a). En ce sens, les conclusions de Lorenzi *et al.* (2014) ont clairement indiqué qu'une souche sélectionnée pour un fort rendement en filet présentait un pourcentage plus élevé d'animaux avec du WS modéré et sévère que ceux appartenant à une souche standard. Ils ont observé des résultats similaires lorsqu'ils comparaient des animaux avec un poids du marché élevé (entre 3,0 et 4,2 kg) et standard (entre 2,2 et 3,0 kg). L'hypertrophie des fibres qui résulte à la fois de l'alourdissement des animaux et de l'augmentation des rendements en filets expliquerait en partie l'apparition des défauts.

Des preuves d'une base génétique des défauts WS et WB, ainsi que des corrélations avec le taux de croissance et le rendement en filet ont également été démontrées. Bailey *et al.* (2015) ont réalisé les premières estimations des paramètres génétiques de plusieurs myopathies (WS, WB, DPM) dans deux lignées de poulet avec des rendements en filet modérés ou forts. Le défaut WS était le plus fréquent dans les deux lignées de poulet. L'incidence des défauts WS et WB était significativement plus élevée dans la lignée à rendement élevé (WS : 49,6%, WB : 3,19%) que dans la lignée à rendement modéré (WS : 14,5%, WB : 0,16%). Toutefois, les corrélations génétiques estimées avec le poids vif ( $r_g$ WS = 0,08 à 0,23,  $r_g$ WB = - 0,03 à 0,16) et le rendement en filet ( $r_g$ WS = 0,03 à 0,25,  $r_g$ WB = 0,002 à 0,14) étaient faibles à modérées dans les deux lignées étudiées. Concernant les héritabilités, elles restent faibles pour le WB (inférieures à 0,1 dans les deux lignées) mais sont modérées pour le WS (de 0,19 dans la lignée à rendement modéré à 0,34 dans la lignée à fort rendement en filet). La faible héritabilité du WB suggère un rôle prédominant des facteurs environnementaux dans la sensibilité à cette myopathie, tels que le temps d'incubation, l'alimentation, et la ventilation qui peuvent influencer les mécanismes de développement et de croissance du muscle (Bailey *et al.*, 2015). Si, comme le soulignent les auteurs, plus de 65% de la variabilité du WS serait due à d'autres facteurs que la génétique, le niveau d'héritabilité de ce défaut est compatible avec la mise en œuvre d'une sélection, d'autant plus qu'il n'existe pas d'antagonisme génétique marqué avec les caractères de croissance dans les deux populations étudiées. La seconde étude génétique menée sur le défaut WS (Alnahhas *et al.*, 2016) souligne quant à elle un fort niveau d'héritabilité du WS ( $h^2 = 0,65$ ), et une corrélation génétique largement positive avec le rendement en filet ( $r_g = 0,68$ ) et la teneur en lipides intramusculaires ( $r_g = 0,64$ ), la corrélation génétique avec le poids vif restant modérée ( $r_g = 0,33$ ). Sur la base de ces estimations, au sein de cette population, la sélection pour une augmentation de la croissance musculaire aurait donc pour conséquence une recrudescence du WS, en cohérence avec les nombreuses observations phénotypiques rapportées dans la littérature. Les différences observées entre les deux études peuvent s'expliquer par l'utilisation de méthodes d'estimation différentes (adaptées ou non à l'analyse génétique de caractères discrets) et des fonds génétiques étudiés. De plus, la notation visuelle des défauts étant une mesure subjective, elle a pu également contribuer à ces différences.

L'ensemble de ces observations confirme que les lignées modernes de poulet de chair, sélectionnées pour un taux de croissance rapide et un rendement en filet élevé, ont une prédisposition pour développer des myopathies du filet. Le fort déterminisme génétique du WS mis en évidence dans l'étude de Alnahhas *et al.* (2016) suggère que la sélection génétique



apparaît comme un des leviers possibles pour réduire l'incidence du défaut et limiter les conséquences indésirables sur la qualité de la viande.

## IV.2 Conditions d'incubation et d'élevage

Quelques études se sont focalisées sur l'effet de modifications des conditions d'élevage et d'incubation sur l'incidence des défauts.

En 2016, une étude testant l'effet de la température d'élevage sur la fréquence et la sévérité des défauts WS et WB au niveau du muscle P. major a été réalisée (Zahoor *et al.*, 2016). Elle visait à comparer deux programmes de température : une température stable de 21°C entre 24 et 39 jours suivant les recommandations du sélectionneur et une température décroissante de 19 à 14°C sur cette même période. L'hypothèse était qu'une température élevée et un contact prolongé avec la litière pourraient empêcher la dissipation de l'extra-chaleur produite par les animaux et provoquer un stress thermique, favorisant l'apparition de défauts notamment au niveau des muscles pectoraux. Cette étude n'a pas mis en évidence d'effet bénéfique de la diminution de la température d'élevage sur l'apparition des défauts musculaires.

Récemment, il a été montré que la durée de stockage des œufs avant l'incubation ainsi que la température d'incubation et le poids des poussins à l'éclosion peuvent avoir une incidence sur les caractéristiques morphologiques des muscles et sur la survenue des défauts musculaires (Clark *et al.*, 2017 ; Livingston *et al.*, 2019a). Livingston *et al.* (2019) ont étudié différentes durées de stockage des œufs avant incubation : une durée courte de 1 à 7 jours, et une durée longue de 8 à 14 jours. A 42 jours, les poulets issus du lot d'œufs stockés sur la plus longue période ont un poids vif et un rendement en P. major inférieurs à ceux qui ont eu une durée de stockage plus courte (3,07 vs 3,18 kg et 656 vs 706g pour le poids vif et le P. major, respectivement). En revanche, aucun effet n'a été observé sur les défauts WS et WB. Clark *et al.* (2017) ont testé une augmentation de la température d'incubation de 37,8°C à 39,5°C pendant 0, 3 ou 12 h par jour sur la période 14 à 18 jours. Les poulets issus du lot exposé à 12 h d'augmentation de la température ont un poids vif inférieur à ceux des autres lots à l'âge de 63 jours (5,32 vs 5,48 et 5,49 kg pour les lots 0 et 3 h, respectivement) et une moindre sévérité des défauts (19,4% de score 2 vs 28,8 et 22,9% pour les lots 0 et 3 h, respectivement). Ces mêmes auteurs ont classé, à l'éclosion, les poussins en 3 lots : précoces, moyens et tardifs. À l'âge de 63 jours, les poulets ayant éclos précocement ont un poids vif supérieur à celui des autres lots (5,52 vs 5,40 et 5,37 kg pour les lots moyen et tardif, respectivement) et une sévérité

accrue des myopathies (30% de score 2 vs 23,1 et 18,0% pour les lots moyen et tardif, respectivement). L'augmentation de la température d'incubation a donc permis de réduire la sévérité des défauts, mais certainement en lien avec la diminution des performances de croissance des poulets.

### IV.3 Conditions d'alimentation

Bien que la sélection génétique sur la croissance et les rendements en filet semble être à l'origine de l'apparition de ces myopathies, la plupart des études visant à limiter l'apparition et la sévérité des défauts musculaires du filet ont été menées dans le domaine de la nutrition animale.

Les principales stratégies consistaient à réduire l'apport alimentaire en énergie ou en acides aminés, soit par restriction alimentaire, soit par changement de formulation (Trocino *et al.*, 2015 ; Cruz *et al.*, 2016 ; Radaelli *et al.*, 2016 ; Bodle *et al.*, 2018 ; Livingston *et al.*, 2018 ; Meloche *et al.*, 2018a ; Meloche *et al.*, 2018c, d, b ; Livingston *et al.*, 2019a ; Sachs *et al.*, 2019 ; Zampiga *et al.*, 2019). Dans l'ensemble, si une réduction de la fréquence des défauts musculaires est observée, elle est presque exclusivement le résultat d'une diminution du taux de croissance, du poids à l'abattage et/ou du rendement en filet (Livingston *et al.*, 2018 ; Meloche *et al.*, 2018a ; Livingston *et al.*, 2019a ; Sachs *et al.*, 2019).

Un rationnement à 80% de l'alimentation à volonté entre 13 et 21 jours a permis de contrôler et réduire la dégénérescence des fibres musculaires et l'incidence des défauts WS et WB durant la phase de rationnement, mais en affectant les performances de croissance tels que le poids à l'abattage et le rendement en filet (Trocino *et al.*, 2015 ; Radaelli *et al.*, 2016). De plus, les animaux restreints ont montré une croissance compensatrice lors de la réalimentation, qui a induit d'importants dommages au niveau des fibres musculaires (Radaelli *et al.*, 2016). L'augmentation de la teneur en lysine digestible dans les régimes croissance (distribués entre 12 et 28 jours) ou finition (28 à 42 jours) a un effet positif sur les performances de croissance et les caractéristiques de la carcasse (poids vif, carcasse, poids et rendement en filet) mais favorise également l'apparition et la sévérité des défauts (Cruz *et al.*, 2016). Tout comme l'augmentation de la teneur en lysine, l'augmentation de la teneur en énergie du régime augmente le poids vif et le poids du filet, mais également la sévérité du défaut WS (Kuttappan *et al.*, 2012a). Seule une restriction alimentaire minimale (95%) et une réduction à court terme de la lysine digestible ont permis de réduire légèrement la gravité des défauts WS et WB sans

altérer de manière considérable les performances de croissance, mais seulement sur la période de rationnement (Meloche *et al.*, 2018c, d). L'adoption de ces stratégies dans des conditions commerciales est difficile car les poulets réalisent une croissance compensatoire après une restriction alimentaire précoce, ce qui peut même augmenter l'incidence des défauts musculaires (Trocino *et al.*, 2015 ; Radaelli *et al.*, 2016).

De manière similaire, différentes approches de supplémentation alimentaire en anticoccidiens, en antioxydants (vitamines E, C et sélénium) ou en oligo-éléments organiques n'ont pas entraîné de véritables effets d'atténuation (Kuttappan *et al.*, 2012b ; Sihvo *et al.*, 2016 ; Sirri *et al.*, 2016 ; Bodle *et al.*, 2018 ; Cemin *et al.*, 2018). L'ajout d'un anticoccidien dans l'alimentation des poulets a conduit à une augmentation de la sévérité du défaut WS après l'abattage à 51 jours, par rapport à des animaux vaccinés ou non traités contre la coccidiose (Dalle Zotte *et al.*, 2015). La supplémentation de plusieurs niveaux de vitamine E (DL-alpha-tocopherol acetate), antioxydant qui peut contribuer à améliorer la qualité de la viande par sa capacité à neutraliser les radicaux libres et réduire la peroxydation des lipides dans le plasma et les muscles squelettiques, n'a montré aucun effet significatif sur le poids et le rendement carcasse, ni sur l'occurrence des défauts (Kuttappan *et al.*, 2012b). Dans cette étude, Kuttappan *et al.* avaient émis l'hypothèse que le défaut WS pouvait être assimilé à des dystrophies musculaires nutritionnelles qui présentaient elles aussi des lésions microscopiques (i.e., dégénération, nécrose, minéralisation, régénération, infiltration par cellules hétérophiles), et étaient caractérisées par des stries blanches dans les muscles squelettiques, principalement sur le muscle du filet mais parfois aussi sur les muscles des pattes (Guetchom *et al.*, 2012). Les dystrophies musculaires nutritionnelles entraînent des pertes de qualité de la viande et sont souvent causées par des déficits en vitamine E et en sélénium dans l'alimentation, surtout quand le régime est pauvre en acide aminés soufrés ou riche en acide gras polyinsaturés (Guetchom *et al.*, 2012). L'absence d'effet significatif de la supplémentation en vitamine E sur l'incidence du défaut WS suggère une étiologie différente de celle des dystrophies musculaires nutritionnelles. La restriction en sélénium dans l'alimentation n'a montré aucun effet sur la fréquence du défaut WB (Sihvo *et al.*, 2016). À l'inverse, l'augmentation de la teneur en sélénium dans le régime alimentaire des poulets augmente la fréquence et la sévérité des défauts WS et WB par l'amélioration des performances des animaux (carcasse et rendement filet) (Cemin *et al.*, 2018). Les stratégies consistant à doubler les doses de vitamines ou supplémenter en vitamine C le régime n'ont montré aucun effet significatif sur le défaut WS (Bodle *et al.*, 2018). En revanche, la seconde stratégie permettait de diminuer légèrement le score du défaut WB par rapport aux

animaux non supplémentés (1,27 vs 1,83, respectivement), sans altérer les performances des animaux (Bodle *et al.*, 2018). L'ajout de différents niveaux de minéraux (zinc, manganèse, cuivre) sous forme organique ou inorganique dans l'aliment n'a également pas montré d'effet sur les défauts WS et WB (Sirri *et al.*, 2016). Diminuer la teneur en phosphore disponible dans l'aliment (0,45%, 0,40% et 0,35% dans l'aliment démarrage, croissance et finition, respectivement) augmente en revanche le score du WB (3,69 vs 2,88) chez des poulets de 43 jours par rapport à une teneur fixée (0,45% dans les trois régimes) mais diminue le score du WS à 35 jours si la teneur en potassium est elle-même diminuée graduellement (Livingston *et al.*, 2019b).

D'autre part, une légère réduction des cas modérés de WB à l'âge de 51 jours a été obtenue par l'apport alimentaire en acide guanidinoacétique. Celui-ci est utilisé comme précurseur de la créatine qui a un rôle majeur dans le métabolisme énergétique cellulaire du muscle, sans altérer les performances de croissance des animaux (Cordova-Noboa *et al.*, 2018a ; Cordova-Noboa *et al.*, 2018b). Cependant, le traitement ne permet pas de réduire la fréquence ou la sévérité du défaut WS, et la réduction des cas modérés de WB n'est plus observable à 55 jours. De plus, une forte interaction avec la composition de l'alimentation (maïs ou sorgho) a été constatée. En revanche, l'ajout d'acide phosphatidique dans le régime n'a aucun effet sur les défauts WS et WB (Sobotik *et al.*, 2018).

Enfin, il a récemment été montré qu'une augmentation du rapport arginine : lysine d'environ 30% (ratio Arg : Lys de 1,35 à 1,37) par rapport aux recommandations actuelles, peut atténuer les défauts musculaires du filet (Zampiga *et al.*, 2019). Toutefois, une étude similaire n'a pas confirmé cette observation (Bodle *et al.*, 2018) et il a été montré qu'une augmentation de seulement 10% du ratio Arg : Lys n'était pas efficace non plus (Zampiga *et al.*, 2018).

En conclusion, il n'existe pas à l'heure actuelle de solutions pratiques en matière de nutrition et de conduite d'élevage pour réduire la fréquence ou la sévérité des défauts musculaires sans affecter négativement les performances des animaux. Les solutions nutritionnelles proposées qui, dans leur ensemble, étaient supposées réduire le stress oxydatif des fibres musculaires associé à la progression des défauts WS et WB, n'ont pas entraîné de véritables effets d'atténuation. Des solutions nutritionnelles agissant sur le métabolisme (précurseur de créatine) ou l'angiogenèse (arginine) récemment testées montrent des effets modérés qu'il est maintenant nécessaire de confirmer.

## V. Mécanismes moléculaires mis en jeu

Ces dernières années, plusieurs études ont décrit la variation globale du niveau d'expression des gènes, des protéines et des métabolites en lien avec l'apparition des défauts. Ces études ont été utiles pour mettre en lumière les mécanismes moléculaires et les voies biologiques impliqués dans l'apparition des myopathies du filet chez les poulets de chair (Mutryn *et al.*, 2015 ; Abasht *et al.*, 2016 ; Zambonelli *et al.*, 2016 ; Kuttappan *et al.*, 2017a ; Sundekilde *et al.*, 2017 ; Boerboom *et al.*, 2018 ; Cai *et al.*, 2018 ; Marchesi *et al.*, 2018 ; Papah *et al.*, 2018 ; Abasht *et al.*, 2019).

### V.1 Transcriptome

Les études menées afin de quantifier l'évolution du profil d'expression des gènes en présence des défauts WS et/ou WB ont mis en évidence une étiologie complexe de ces myopathies (**Tableau 7**). En effet, l'analyse fonctionnelle a révélé un nombre important de fonctions biologiques régulées en lien avec l'apparition des défauts WS et/ou WB.

**Tableau 7** : Analyses transcriptomiques de filets présentant les défauts WS et/ou WB

Référence	Technique	Comparaison	Animaux	Nombre de gènes DE	Principales fonctions/processus biologiques
(Mutryn <i>et al.</i> , 2015)	RNA-seq	WB vs Normal	Mâles de 47 jours, à fort rendement en filet	1637	Homéostasie du calcium, stress oxydatif, hypoxie localisée, switch de la typologie des fibres et réparation cellulaire
(Zambonelli <i>et al.</i> , 2016)	microarray	WSWB vs Normal	Mâles, Ross 708, autour de 3,7 kg	207	Développement musculaire, processus métaboliques des polysaccharides, métabolisme du glucose, synthèse des protéoglycanes, inflammation, stress oxydatif et voie de signalisation du calcium
(Marchesi <i>et al.</i> , 2018)	RNA-seq	WS vs Normal	Mâles de 42 jours, Cobb 500	1441	Activation du système immunitaire, angiogenèse, hypoxie, stress oxydatif, mort cellulaire, inflammation, métabolisme des carbohydrates, niveau de calcium intracellulaire, contraction des muscles striés, et développement musculaire
(Papah <i>et al.</i> , 2018)	RNA-seq	WB vs Normal à 2, 3 et 4 semaines	Mâles, à fort rendement en filet, de 2,3 ou 4 semaines	41 (2 sem.) 618 (3 sem.) 39 (4 sem.)	Métabolisme énergétique, réponse à l'inflammation, maladie vasculaire (phlébite), remodelage de la matrice extracellulaire
(Abasht <i>et al.</i> , 2019)	RNA-seq	HFE vs LFE <sup>1</sup>	Mâles, 47 jours	1059	Métabolisme des carbohydrates, métabolisme des lipides, métabolisme des acides nucléiques

<sup>1</sup>HFE = High feed efficiency, LFE = low feed efficiency. Cette étude visait à caractériser les différences métaboliques entre des poulets HFE et LFE pour savoir pourquoi les animaux les plus efficaces étaient plus sensibles au défaut WB.

Mutryn *et al.* (2015) ont été les premiers à réaliser une analyse transcriptomique des filets atteints par du WB *via* une étude RNA-seq. Ils ont mis en évidence 1637 gènes différentiellement exprimés (DE) entre les filets atteints par du WB et les non atteints. Zambonelli *et al.* (2016) sont les seuls à avoir étudié les profils transcriptomiques des filets présentant à la fois les défauts WS et WB. L'analyse microarray a révélé 207 gènes différentiellement exprimés entre les muscles atteints et sains. L'étude RNA-seq de Marchesi *et al.* (2018) a révélé quant à elle 1441 gènes DE entre des muscles atteints de WS et des muscles sains. Enfin, Papah *et al.* (2018) ont comparé les profils d'expression des gènes de muscles P. major au cours du développement (semaines 2 à 4) dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition et la progression du défaut WB au sein des lignées modernes de poulets de chair au début de la période de croissance.

Globalement, ces études transcriptomiques mettent en évidence des modifications métaboliques au sein des muscles atteints. Les études s'accordent pour dire qu'il y a une altération des voies métaboliques servant à produire de l'énergie avec notamment une diminution de l'expression des enzymes de la glycolyse. Certaines d'entre elles suggèrent une réorientation de l'utilisation du glucose en faveur de la synthèse de composants de la matrice extracellulaire (protéoglycanes, glycosaminoglycanes), conduisant aux phénomènes de fibrose. Mutryn *et al.* (2015) sont les seuls à proposer un changement de la typologie des fibres (de type IIa glycolytique à type I oxydative) dans ces muscles. Du stress oxydant et une augmentation du calcium intracellulaire ont également été mis en évidence dans ces muscles, entraînant respectivement des phénomènes inflammatoires et l'activation de protéases et de lipases, qui peuvent être à l'origine de la dégénérescence et de la régénération des fibres. De façon cohérente, une grande partie des régulations d'expression génique observées peuvent être reliées aux lésions musculaires observées histologiquement et décrites précédemment.

Ces études transcriptomiques ont révélé des modifications métaboliques et structurales associées aux myopathies, sans permettre cependant de dissocier les possibles causes des conséquences du développement des myopathies. À ce jour, malgré les nombreuses descriptions des altérations histologiques, biochimiques, métaboliques et moléculaires qui accompagnent l'apparition des défauts WS et WB, il n'y a pas de consensus concernant les causes qui ont conduit à leur mise en place. Ces résultats sont toutefois précieux puisqu'en décrivant de manière exhaustive les modifications physiologiques ou pathologiques ils peuvent informer sur les causes possibles impliquées dans l'apparition des défauts voire suggérer des solutions pour les réduire. Associés aux observations obtenues à ce jour aux niveaux génétique,

biochimique et histologique, ils ont permis de définir certaines hypothèses possibles sur les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces myopathies. Ainsi, la plupart des résultats rapportés dans la littérature suggèrent que la sélection des souches de poulet pour une croissance rapide et un rendement en filet élevé a augmenté le stress oxydatif au sein des muscles en partie à l'origine des différentes altérations observées.

Marchesi *et al.* (2018) émettent l'hypothèse que la diminution des mouvements et la compression du muscle P. major auraient entraîné un déficit d'irrigation sanguine dans le muscle, susceptible d'entraîner une série de processus physiologiques, comme l'activation de la glycolyse, la réaction à l'hypoxie, l'augmentation du calcium intracellulaire et l'apoptose, conduisant à des lésions musculaires et probablement à l'apparition du défaut WS. L'étude de Papah *et al.* (2018) informe également sur les mécanismes moléculaires à l'origine du développement précoce du défaut WB. Ils sont principalement liés à des modifications vasculaires, notamment mises en jeu en cas de phlébite et dont le rôle dans l'apparition du WB avait déjà été mis en évidence dans une étude précédente (Papah *et al.*, 2017). De façon intéressante, les résultats de cette dernière étude montrent que les perturbations cellulaires et moléculaires majeures qui sont liées au défaut WB sont déjà présentes à l'âge de 3 semaines, avant même que la maladie ne devienne détectable par palpation. Ces résultats sont importants puisqu'ils suggèrent que pour prévenir l'apparition du WB il faudra agir précocement durant le développement de l'animal.

## V.2 Protéome

Le profil d'expression protéiques des muscles atteints par les défauts WS et WB a également été décrit dans la littérature. Ainsi, un total de 141 protéines différentielles a pu être mis en évidence entre des filets sans lésions myopathiques ou légèrement atteints et ceux présentant le défaut WS à l'état sévère (Kuttappan *et al.*, 2017a). Les protéines surexprimées en présence du défaut interviennent dans des voies de signalisation qui contrôlent le métabolisme protéique (synthèse, modification post-traductionnelle et repliement des protéines) et la réponse au stress cellulaire. L'augmentation de la synthèse des protéines dans les muscles sévèrement atteints pourrait être liée à la croissance rapide des muscles ainsi qu'aux processus de dégénérescence et de réparation associés. Les protéines sous exprimées dans les muscles présentant du WS sévère sont quant à elles associées au mouvement cellulaire et au métabolisme des glucides (glycolyse, gluconéogenèse). Les auteurs émettent l'hypothèse que l'altération du métabolisme des glucides dans les muscles sévèrement atteints pourrait être due à la réorientation des

métabolites issus de ces voies vers la synthèse de collagène, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes pour lutter contre le stress oxydatif et supporter la détoxification et les processus de régénération musculaire.

Récemment, les résultats d'une analyse protéomique de muscles présentant ou non le défaut WB confirment les différences d'abondance relative des protéines glycolytiques, ainsi que de celles impliquées dans la réponse au stress oxydant (Cai *et al.*, 2018).

### V.3 Métabolome

En ce qui concerne les métabolites, il a été indiqué dans une partie précédente (Cf. II.2) que les poulets atteints de WS ont des profils hématologiques, y compris en nombre de leucocytes, et en métabolites sériques et électrolytes similaires à ceux des animaux indemnes de défauts (Kuttappan *et al.*, 2013b). Cependant, une augmentation significative de la concentration sérique de plusieurs enzymes liées à l'apparition des lésions musculaires (alanine aminotransférase, phosphatase alcaline, aspartate aminotransférase, créatine kinase et lactate déshydrogénase) a été observée chez les animaux atteints de WS (Kuttappan *et al.*, 2013b).

Une approche par résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis d'évaluer le profil métabolomique de muscles atteints ou pas par le défaut WB (Sundekilde *et al.*, 2017). Il a été montré que les muscles atteints par le WB présentent des teneurs inférieures en ansérine, carnosine et créatine, ce qui peut indiquer une altération possible de l'homéostasie musculaire et des voies de production de l'énergie. Le profil métabolique du muscle P. major affecté par le défaut WB a également été étudié par Abasht *et al.* (2016). Dans cette étude, 140 métabolites différents ont été identifiés entre les muscles sains et atteints. Les composés identifiés étaient principalement associés à un stress oxydatif accru, des taux de protéines élevés, une dégradation du muscle, une altération du métabolisme du glucose et du glycogène, ainsi qu'un remodelage excessif de la MEC. La teneur en glycogène était également plus faible dans les muscles affectés par le WB. Cette diminution, associée à une altération de la glycolyse, peut être due à un changement d'utilisation du glucose plutôt qu'à un manque de disponibilité de celui-ci. En effet, il a été rapporté une sur-activation de la voie de biosynthèse de l'ascorbate, qui pourrait être impliquée dans l'épuisement du glycogène, le remodelage excessif de la MEC (synthèse de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes) et le stress oxydatif dans les échantillons atteints. Abasht *et al.* (2016) ont également observé un niveau élevé de xanthine et d'hypoxanthine dans ces muscles, qui sont tous deux des produits de dégradation de la purine et peuvent être des



marqueurs du stress oxydatif. Enfin, Boerboom *et al.* (2018) ont récemment identifiés 63 métabolites différentiels entre des muscles atteints ou non de WS. Ces métabolites sont principalement impliqués dans l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, ainsi que le métabolisme de l'arginine et de la taurine. Le déclencheur général de ces modifications semble être une situation hypoxique présente dans le tissu musculaire des filets des poulets de chair. Cet état hypoxique irait de pair avec le stress oxydatif, qui conduit à des dommages musculaires. Dans cette étude, Boerboom *et al.* (2018) supposent que les poulets présentant du WS ont un système vasculaire dans le muscle limité : il permettrait de soutenir la croissance musculaire, mais pourrait être insuffisant pour maintenir la santé musculaire sous condition de stress.

L'ensemble des analyses haut débit (transcriptomique, protéomique, métabolomique) réalisées sur les muscles atteints par les défauts WS et WB mettent en évidence des altérations du métabolisme des glucides et de la synthèse des protéines, une augmentation importante du stress oxydant, associée à des phénomènes d'inflammation localisée et d'hypoxie. Toutefois, l'origine exacte et la chronologie des processus ou dérégulations biologiques conduisant au développement de ces défauts restent encore à ce jour insuffisamment comprises et nécessitent l'acquisition de données complémentaires, notamment au niveau génétique ou des facteurs de risques liés aux conditions de production des animaux. En effet, malgré la description relativement fine des processus biologiques qui sous-tendent l'apparition des défauts WS et WB, la question reste entière concernant la ou les causes responsables de l'apparition des défauts : mutations ? Changement physiologique progressif ? Évolutions des besoins de l'animal ? Changements des pratiques de production (reproduction, incubation, élevage, nutrition) ? Répondre à ces questions permettra d'avancer dans la recherche de solutions pour réduire l'incidence de ces défauts en abattoirs au bénéfice de la compétitivité des filières et de la qualité des produits.

## VI. Conclusion et enjeux pour la filière

La production de volailles de chair conventionnelle (poulet en particulier) est actuellement confrontée à des problèmes de qualité qui pénalisent d'ores et déjà fortement sa compétitivité et peuvent à terme ternir son image. En effet, les progrès continus réalisés depuis de nombreuses années en termes de vitesse de croissance et d'augmentation des rendements en filet ont conduit à la production de muscles dont les caractéristiques ont progressivement évolué (baisse des réserves énergétiques, hypertrophie des fibres musculaires, vascularisation insuffisante) jusqu'à entraîner des dérégulations métaboliques et cellulaires à l'origine des défauts actuels. Les lésions qui sont apparues sont apparentées à des myopathies qui pourraient aussi impacter le bien-être et la santé des volailles. En outre, elles pourront à terme induire des pertes économiques importantes à l'abattoir, avec des retraits ou des déclassements qui seront de plus en plus nombreux si la sévérité des défauts WS et WB ne cesse d'augmenter. Pourtant, malgré les efforts considérables déployés au cours des dernières années au travers d'études histopathologiques, sérologiques, l'utilisation d'approches à haut-débit (transcriptome, métabolome, protéome), l'étiologie précise de ces myopathies demeure incertaine. La comparaison des défauts WS et WB avec diverses myopathies connues (dystrophies musculaires héréditaires, des myopathies nutritionnelles, ou toxiques) suggère que ces anomalies musculaires chez les souches actuelles de poulet peuvent avoir une étiologie différente. Les effets négatifs de ces défauts musculaires sur l'apparence, la qualité technologique et nutritionnelle et l'acceptation par le consommateur des filets de poulet ont été clairement démontrés. Les attentes de la filière sont donc extrêmement fortes pour comprendre les causes et les mécanismes biologiques qui ont conduit à l'apparition de ces défauts et pour trouver des solutions (génétiques, nutritionnelles ou d'élevage) pour limiter leur incidence et leur gravité sans compromettre la compétitivité des filières.

Afin de limiter leur apparition, plusieurs solutions se sont montrées efficaces, mais elles entraînent toutes des baisses de performances en élevage et donc une augmentation du prix de production. Ceci passe par exemple par la limitation de la vitesse de croissance, la réduction du poids et de l'âge à l'abattage, la réduction des apports énergétiques et/ou protéiques ou encore l'utilisation de souches moins performantes et/ou moins conformées. Certains spécialistes suggèrent également d'éviter les sources de stress pour les animaux, de revoir les apports en vitamines et oligo-éléments dans les aliments, d'assurer une bonne prophylaxie vaccinale, etc. Cependant, aucune étude publiée à ce jour n'a apporté d'éléments probants concernant un effet bénéfique de ce type de solution sur l'apparition des défauts musculaires chez le poulet.

La problématique reste donc complexe bien que les recherches menées ces dernières années ont permis d'améliorer nos connaissances sur les différents processus biologiques impliqués dans le développement de ces défauts. L'existence d'une base génétique a également été démontrée, indiquant que la sélection apparaît comme un des leviers possibles pour réduire l'incidence de ces myopathies. Toutefois, elle est pour l'instant insuffisamment exploitée par la filière. Ceci s'explique en partie par la lourdeur des mesures de qualité et l'absence d'indicateurs précoces (in vivo) et d'outils de diagnostic fins, robustes, quantitatifs et utilisables en sélection et en élevage, qui permettraient d'estimer de manière suffisamment fiable le degré d'atteinte des muscles concernés par ces défauts. Par comparaison avec l'ensemble des facteurs étudiés, les études menées sur le contrôle génétique des défauts musculaires restent encore limitées et doivent donc être développées.

À l'heure actuelle, le diagnostic des défauts WS et WB repose principalement sur la notation visuelle des filets à l'abattoir, qui reste une mesure subjective. L'échelle de score établie par Kuttappan *et al.* (2013c) est largement utilisée dans plusieurs études. Toutefois, son efficacité dépend de plusieurs facteurs. Il est important de réaliser la notation des filets dans des conditions similaires pour éviter les biais : température, humidité, source de lumière et intensité lumineuse dans la pièce, âge post-mortem, température de l'échantillon, etc. (Kuttappan *et al.*, 2016). Dans l'idéal, pour avoir des résultats comparables, il faudrait que la ou les mêmes personnes notent les défauts. De plus, comme l'incidence des défauts WS et WB augmente au fil des ans, il est possible que le degré de gravité augmente également. Dans ce cas, l'échelle doit être mise à jour, en tenant compte de la gradation des défauts effectivement observés sur le terrain.

L'utilisation de techniques objectives telles que l'analyse d'images a été récemment évaluée pour classer les filets selon le degré de sévérité du défaut WS (Kato *et al.*, 2018). Dans cette étude, quatre modèles ont été évalués pour tester leur capacité à classer les échantillons selon trois degrés de sévérité et ont montré un taux de réussite allant de 70,9% à 86,4%. L'utilisation de méthodes spectrales a également été testée pour détecter de manière rapide, objective et non-intrusive les défauts WS et WB sur la chaîne d'abattage et ainsi éviter la notation par un tiers (Traffano-Schiffo *et al.*, 2017 ; Wold *et al.*, 2017 ; Geronimo *et al.*, 2019 ; Jiang *et al.*, 2019 ; Wold *et al.*, 2019). Certaines de ces méthodes se basent sur la teneur en protéines et le degré de rétention d'eau dans le muscle pour discriminer les muscles atteints par le défaut WB, et montrent un taux de classifications correctes compris entre 96 et 99,5% (Wold *et al.*, 2017 ; Wold *et al.*, 2019). Une autre combine les informations spectrales et les analyses d'image pour

évaluer le défaut WB avec 97,5% de réussite. Enfin, Jiang *et al.* (2019) utilisent les spectres proches infra-rouge pour différencier les filets WS des filets normaux avec un taux de classifications correctes de 91,7%. Des méthodes d'évaluation du défaut WB sur animal vivant ont été évaluées, basées notamment sur la palpation des muscles pectoraux ou encore en testant la capacité des animaux à lever suffisamment haut les ailes dans le dos pour qu'elles puissent se rejoindre (Kawasaki *et al.*, 2016), mais ces méthodes restent imparfaites. En effet, 70% des animaux identifiés comme ne présentant pas de WB par palpation avaient des lésions musculaires observables par examen histologique (Velleman and Clark, 2015).

Disposer d'indicateurs précis (marqueurs génétiques ou phénotypes quantitatifs), et dans l'idéal précoces et non invasifs, faciliterait grandement la sélection contre les défauts, mais aussi la recherche de solutions alimentaires ou d'élevage favorisant une croissance harmonieuse du muscle sans apparition de lésions myopathiques. Le caractère non invasif des outils de phénotypage permettrait également d'éviter la sélection sur collatéraux, moins efficace et plus coûteuse que la sélection directe des reproducteurs.

Enfin, une autre voie est que la filière réfléchisse à des systèmes de production innovants, basés sur l'utilisation de souches sans doute moins performantes mais plus robustes qui permettraient des gains de compétitivité et plus généralement de durabilité en limitant les problèmes de santé et de bien-être en élevage et les pertes de produits à l'abattoir et au cours de la transformation. Là encore, le développement d'outils de prédiction ou de phénotypage quantitatif des défauts sera utile puisqu'ils permettront de faire le lien entre les performances de croissance et de composition corporelle des animaux et les propriétés intrinsèques de leurs muscles en lien avec la qualité de la viande.

DEUXIEME PARTIE :  
OBJECTIFS, MODELES ANIMAUX ET  
DEMARCHES EXPERIMENTALES

---

## I. Rappel des objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu au travers de l'étude bibliographique, les nombreux travaux scientifiques menés sur les défauts WS et WB ont permis de mieux comprendre les voies métaboliques et les modifications structurales associées à l'apparition des défauts, même si les mécanismes causaux restent encore à élucider. Si la sélection génétique semble un levier majeur d'action dans la lutte contre ces défauts, des limites existent liées notamment à la faiblesse du phénotypage aujourd'hui basé sur une notation visuelle et subjective et à la mauvaise connaissance de l'architecture génétique des défauts. Les objectifs de la thèse étaient donc i) de mieux comprendre les mécanismes génétiques et plus largement biologiques contribuant à l'apparition des défauts WS et WB chez le poulet et ii) de développer des outils d'aide à la sélection par l'identification de marqueurs génétiques et biologiques et de nouveaux indicateurs fins des défauts. La thèse a bénéficié de deux modèles génétiques complémentaires qui sont décrits dans le prochain paragraphe : (1) un modèle original de deux lignées divergentes sélectionnées pour la qualité technologique de leur viande au travers de la mesure du pH ultime, et dans lesquelles le défaut white striping est présent et (2) une lignée à forte croissance et qui présente une proportion significative des défauts WS mais aussi WB.

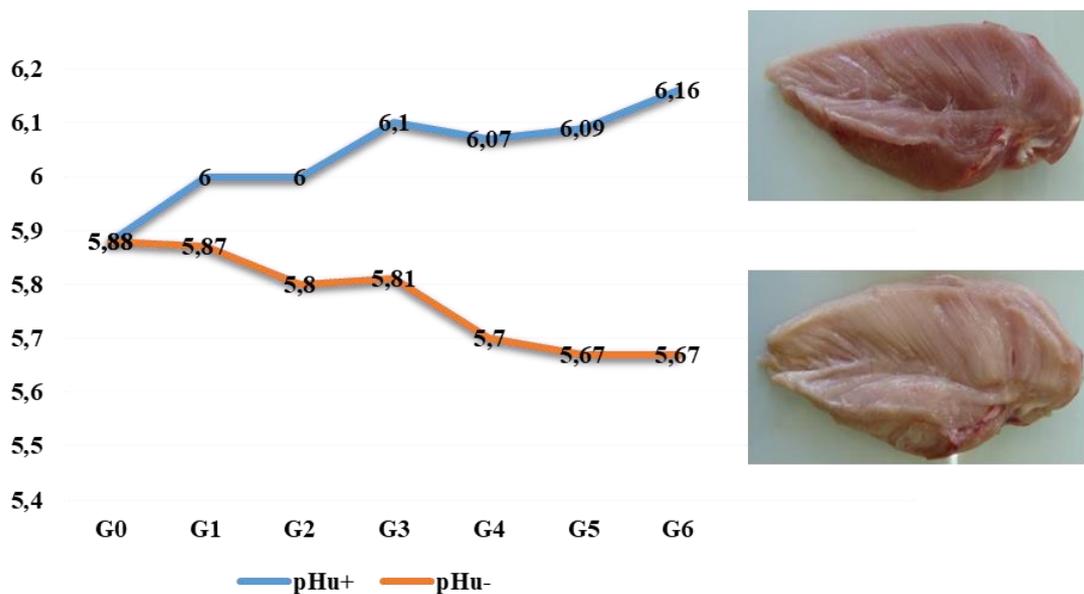
## II. Modèles animaux

### II.1 Les lignées divergentes pHu+/pHu-

Les animaux utilisés au cours de la première partie de la thèse étaient issus de la 6<sup>ème</sup> génération d'une expérience de sélection divergente sur la qualité de la viande évaluée au travers de la mesure du pHu du filet. L'expérience, initiée en 2009 à l'INRA, a permis la création de deux lignées divergentes : la lignée pHu+ sélectionnée pour une valeur génétique élevée du pHu du filet, et la lignée pHu- pour une valeur génétique faible. La population de base à l'origine des deux lignées divergentes était une souche grand-parentale standard (à croissance rapide) de type femelle, sélectionnée par Hubbard pour un équilibre entre croissance et reproduction. Une sélection sur collatéraux a été mise en œuvre avec, à chaque génération, un lot d'animaux futurs reproducteurs et un à deux lots d'animaux issus des mêmes parents et destinés à la mesure du pHu de la viande après abattage des animaux à l'âge 6 semaines (Alnahhas *et al.*, 2014).

L'analyse génétique réalisée sur les 5 premières générations de sélection a confirmé un fort déterminisme génétique du pHu du filet, dont l'héritabilité a été estimée à 0,57 (Alnahhas *et al.*, 2014). Il existe un lien génétique entre le métabolisme musculaire du filet et de la cuisse

(muscle *sartorius*), avec une corrélation génétique positive de 0,54 entre les mesures du pHu faites dans ces deux muscles. L'expérience de sélection divergente s'est avérée très efficace puisqu'après 6 générations, le pHu du filet était de 5,67 dans la lignée pHu- et de 6,16 dans la lignée pHu+ (p-value < 0,0001) (**Figure 15**). Cela correspondait à une fréquence de 61% de viande de type acide (pHu < 5,7) dans la lignée pHu- et 63% de viande de type DFD (pHu > 6,1) dans la lignée pHu+ (Le Bihan-Duval *et al.*, 2018). Bien que moindre, la différence de pHu était également significative dans la cuisse (6,20 et 6,53 dans les lignées pHu- et pHu+, respectivement). Les conséquences sur la qualité technologique sont majeures avec une viande du filet plus pâle (augmentation du L\*) et plus jaune (augmentation du b\*) dans la lignée pHu-, caractérisée également par des pertes en eau par exsudation et lors de la cuisson plus importantes ainsi qu'une résistance au cisaillement plus élevée (Alnahhas *et al.*, 2014). Au niveau sensoriel, on détecte un goût acide plus prononcé pour les filets de la lignée pHu- qui sont également jugés moins tendres et plus fibreux (Alnahhas *et al.*, 2015). Globalement, ces résultats sont en faveur d'une amélioration des propriétés technologiques et sensorielles de la viande dans la lignée pHu+ et de leur dégradation dans la lignée pHu-.

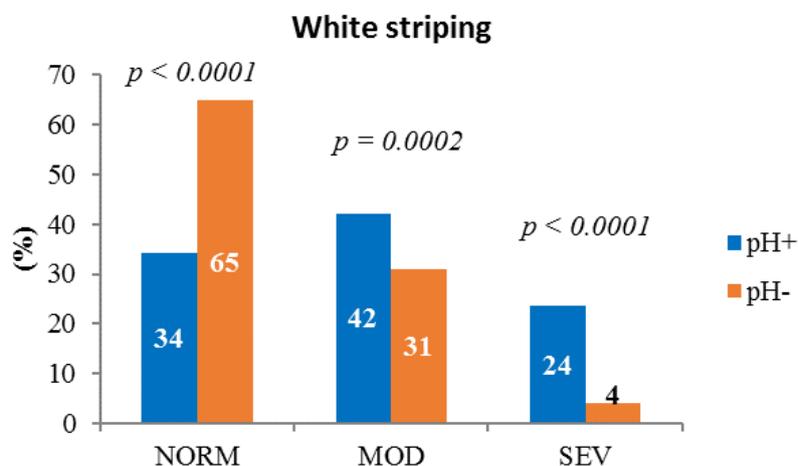


**Figure 15** : Évolution du pHu du filet au cours de la sélection divergente des lignées pHu

L'analyse des performances des animaux a montré que la sélection pour une augmentation du pHu s'était accompagnée d'une légère augmentation du rendement en viande (filet et cuisse) sans que la croissance globale et l'engraissement de l'animal ne soient impactés. Cette croissance musculaire plus importante dans la lignée pHu+ (+ 1 point environ) ne s'accompagne pas d'une modification de composition chimique du muscle (teneurs en protéines, lipides et matière sèche équivalentes). Il existe cependant des modifications ciblées du métabolisme

énergétique avec un PG ainsi que des teneurs résiduelles en glycogène et en lactate plus élevés dans la lignée pHu- par rapport à la lignée pHu+ (Alnahhas *et al.*, 2015). Cette teneur en glycogène résiduelle plus importante pourrait avoir un effet pro-oxydant dans la lignée pHu- où on observe un taux d'oxydation des lipides (indice TBA-RS) plus élevé. L'analyse histologique des muscles a par ailleurs montré que, si la taille des fibres musculaires n'était pas modifiée, le nombre de capillaires par fibre est légèrement plus faible dans la lignée pHu+ par rapport à la lignée pHu- (0,22 vs 0,26,  $p$ -value < 0,05) (Alnahhas *et al.*, 2015). Ceci pourrait impacter l'apport en nutriments et en oxygène ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques, et donc le bon fonctionnement musculaire.

Les observations visuelles réalisées sur plus de 1300 animaux des 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> générations de sélection ont montré que le défaut WS était présent dans ces populations, avec une fréquence nettement plus élevée dans la lignée pHu+, notamment pour les cas les plus sévères, qui représentent 24% des animaux contre 4% dans la lignée pHu- (**Figure 16**). L'analyse de ces données a aussi confirmé qu'il existait une base génétique importante du WS dans cette population (avec une héritabilité de 0,65) et des liens génétiques défavorables avec le poids vif ( $r_g = 0,30$ ) mais surtout le rendement en filet des animaux ( $r_g = 0,68$ ) (Alnahhas *et al.*, 2016).



**Figure 16** : Incidence de défaut WS modéré ou sévère dans les lignées divergentes pHu+ pHu- évaluées aux 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> générations de sélection

Les animaux de la 6<sup>ème</sup> génération ayant fait l'objet d'un génotypage (sur puce SNP Illumina 57K), nous avons tiré profit de ce dispositif animal original pour préciser l'architecture génétique du WS par une analyse de génétique d'association entre marqueur SNP et phénotype (GWAS). Les performances de croissance et de qualité de la viande des 558 animaux utilisés dans l'analyse GWAS sont reportées dans le **Tableau 8** ci-dessous.



**Tableau 8** : Statistiques descriptives des valeurs de pH, qualité de la viande, croissance et composition corporelle des animaux de la 6<sup>ème</sup> génération de sélection des lignées pHu+ et pHu- abattus à 6 semaines

Caractère	Moyenne	LSMEANS / pHu+	LSMEANS /pHu-	Signification Effet lignée
<b>pHu filet</b>	5,91	6,16	5,67	p < 0,0001
<b>pHu cuisse</b>	6,36	6,53	6,20	p < 0,0001
<b>pH15 filet</b>	6,71	6,74	6,68	p < 0,0001
<b>L*</b>	48,9	44,8	52,9	p < 0,0001
<b>a*</b>	-0,09	-0,23	0,04	p < 0,0001
<b>b*</b>	11,8	10,7	12,8	p < 0,0001
<b>Exsudat (%)</b>	3,2	2,0	4,3	p < 0,0001
<b>Perte à la cuisson (%)</b>	9,9	9,1	10,8	p < 0,0001
<b>Résistance au cisaillement (N)</b>	13,6	11,1	16,1	p < 0,0001
<b>Rendement technologique (%)</b>	84,9	86,3	83,5	p < 0,0001
<b>Lipides intramusculaires (%)</b>	1,44	1,45	1,45	p = 0,92
<b>TBA-RS</b>	0,41	0,32	0,51	p < 0,0001
<b>Poids vif (g)</b>	2784	2787	2815	p = 0,18
<b>Rendement gras (%)</b>	1,9	1,89	1,86	p = 0,26
<b>Rendement filet (%)</b>	20,7	21,0	20,4	p < 0,0001
<b>Rendement cuisse (%)</b>	22,5	22,7	22,4	p = 0,0003

## II.2 Souche commerciale à croissance rapide sélectionnée sur le rendement en filet

La seconde approche expérimentale de la thèse visait à aller plus loin dans la caractérisation moléculaire des défauts et leur phénotypage histologique, en tirant profit d'une lignée sélectionnée par Hubbard sur la croissance et le rendement en filet, présentant non seulement le défaut WS mais aussi WB.

176 animaux ont été élevés et abattus à l'INRA à l'âge de 6 semaines. Parmi eux, 55% présentaient du WS et 26% étaient atteints de WB. En tenant compte de la notation visuelle des filets pour les défauts WS et WB, ainsi que des caractéristiques de croissance corporelle (rendement en filet, poids vif), 4 groupes ont été formés : un groupe témoin (n=10) avec absence de défauts visuels sur les filets (WS=0 et WB=0), un groupe WS (n=10) composé uniquement de WS sévère (WS=2 et WB=0), un groupe WB (n=10) composé uniquement de WB modéré ou sévère (WB=1 ou 2 et WS=0), et enfin un groupe WSWB (n=9) sévèrement atteint par les deux défauts (WS=2 et WB=2). Les caractéristiques corporelles et de qualité de viande de ces 4 groupes sont reportées dans le **Tableau 9**.

Les animaux issus des 4 groupes présentent des caractéristiques de croissance et de composition corporelle similaires à l'exception du rendement en P. major qui est significativement supérieur pour les individus atteints du défaut WB seul ou associé au WS, par rapport au groupe témoin. Ces mêmes animaux présentent un pH15 inférieur à celui des deux autres groupes (T et WS) alors qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes pour le pHu du P. major. Les muscles présentant le défaut WB, seul ou associé au WS, ont un niveau d'exsudat supérieur par rapport aux muscles normaux, ce niveau étant toutefois supérieur dans le groupe présentant uniquement le défaut WB. Les pertes à la cuisson sont significativement plus élevées dans les muscles WB ou WSWB par rapport aux deux autres groupes, alors que le rendement technologique est significativement inférieur. Il n'y a pas de différence de couleur entre les différents groupes. De plus, même si la texture du muscle frais est très différente pour le défaut WB, on n'observe plus de différence de force de cisaillement après cuisson. Concernant les filets présentant uniquement le défaut WS à l'état sévère et quel que soit le paramètre de qualité considéré, la différence n'est pas significative avec les filets normaux. L'effet du WB est plus marqué sur la qualité technologique du filet de poulet que celui du défaut WS, sauf si ce dernier est associé au défaut WB.

**Tableau 9** : Caractéristiques de carcasse et de qualité de viande pour les animaux des 4 groupes abattus à 6 semaines

Variable <sup>1</sup>	T (n=10, 5♂,5♀)	WS (n=10, 5♂,5♀)	WB (n=10, 3♂,7♀)	WSWB (n=9, 3♂,6♀)	Probabilité <sup>2</sup>
Poids vif (g)	3210 ± 187	3468 ± 210	3253 ± 195	3435 ± 265	ns
Rendement P. major (%)	17,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	18,0 ± 1,0 <sup>ab</sup>	18,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	18,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	p < 0,05
Rendement P. minor (%)	4,02 ± 0,30	3,94 ± 0,29	4,06 ± 0,36	3,74 ± 0,34	ns
Rendement filet (%)	21,1 ± 1,4	22,0 ± 1,1	22,3 ± 1,7	22,3 ± 1,4	ns
Rendement gras (%)	1,72 ± 0,32	1,61 ± 0,47	1,79 ± 0,39	1,84 ± 0,35	ns
pHu filet	5,90 ± 0,11	5,80 ± 0,08	5,88 ± 0,10	5,92 ± 0,19	ns
pH15	6,81 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,80 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,73 ± 0,08 <sup>b</sup>	6,74 ± 0,08 <sup>b</sup>	p < 0,05
Exsudat (%)	2,26 <sup>a</sup> ± 0,86	2,76 <sup>ab</sup> ± 0,89	5,83 <sup>c</sup> ± 1,66	3,94 <sup>b</sup> ± 0,90	p < 0,001
Perte à la cuisson (%)	13,6 <sup>a</sup> ± 3,0	14,9 <sup>a</sup> ± 3,1	18,2 <sup>b</sup> ± 2,4	18,6 <sup>b</sup> ± 3,3	p < 0,001
Rendement technologique (%)	83,0 <sup>a</sup> ± 2,3	80,2 <sup>ab</sup> ± 3,4	78,9 <sup>b</sup> ± 5,4	78,9 <sup>b</sup> ± 5,7	p < 0,05
L*	50,9 ± 2,9	53,4 ± 2,5	54,2 ± 2,8	52,8 ± 2,8	ns
a*	- 0,97 ± 0,44	- 0,92 ± 0,49	- 0,95 ± 0,46	- 0,91 ± 0,36	ns
b*	10,2 ± 0,6	11,0 ± 0,1	11,3 ± 0,8	11,0 ± 1,3	ns
Résistance au cisaillement (N)	12,8 ± 1,0	12,7 ± 1,9	13,3 ± 2,2	12,9 ± 1,8	ns
TBA-RS	0,48 ± 0,15	0,52 ± 0,19	0,65 ± 0,34	0,58 ± 0,21	ns

<sup>1</sup>Moyenne ± écart-type

<sup>2</sup>ANOVA réalisée avec le facteur groupe pour chaque variable. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les groupes, déterminées par comparaison deux à deux (p-value ≤ 0,05).

### III. Démarches expérimentales

La démarche scientifique s'est appuyée sur des approches haut débit, de génétique d'association et de génomique (transcriptome, protéome), réalisées en complément d'analyses histologiques permettant l'évaluation fine des défauts (**Figure 17**). Elle se découpe en deux parties.

(1) La première partie de la thèse s'est intéressée à l'analyse génétique du défaut WS en s'appuyant sur les données de phénotypage et de génotypage mesurées au sein des lignées divergentes pHu+ et pHu. Celles-ci nous ont permis d'identifier des premières régions QTL du WS chez le poulet et des gènes candidats, positionnels et fonctionnels. Le dispositif a également permis d'aborder la question de l'interaction entre déterminisme génétique du défaut WS et métabolisme énergétique musculaire, qui varie largement entre les deux lignées divergentes.

Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique publié en mars 2018 dans *BMC Genomics* et de deux communications présentées dans des congrès internationaux (**Annexe 1**). La publication intitulée « **Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens** » correspond au premier chapitre de l'étude expérimentale.

(2) La deuxième partie de la thèse avait pour objectifs d'une part, d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui contribuent à l'apparition des défauts WS et WB, et d'autre part, d'affiner le phénotypage des défauts au travers de mesures histologiques quantitatives et moléculaires. Elle a rassemblé plusieurs approches : une analyse protéomique, une analyse histologique et une analyse transcriptomique sur puce à ADN 8x60K, toutes conduites sur les muscles P. major issus du second dispositif animal (décrit en II.2). L'analyse protéomique a permis d'affiner le dispositif expérimental pour l'étude transcriptomique. Une partie des analyses histologiques a permis de confirmer les modifications structurales des muscles atteints de WS, de WB ou des deux défauts à la fois.

Les travaux portant sur la recherche de phénotypes histologiques fins pour quantifier le degré des lésions musculaires ainsi que sur le transcriptome de muscle P. major d'animaux atteints ou non de myopathies sévères sont présentés sous la forme d'un article intitulé « **Differential expression and co-expression gene network analyses reveal molecular mechanisms and candidate biomarkers involved in breast muscle myopathies in chicken** » soumis en avril 2019 à la revue *Scientific Reports*. Ils ont également fait l'objet d'une communication orale aux Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras en mars 2019 (**Annexe 1**).

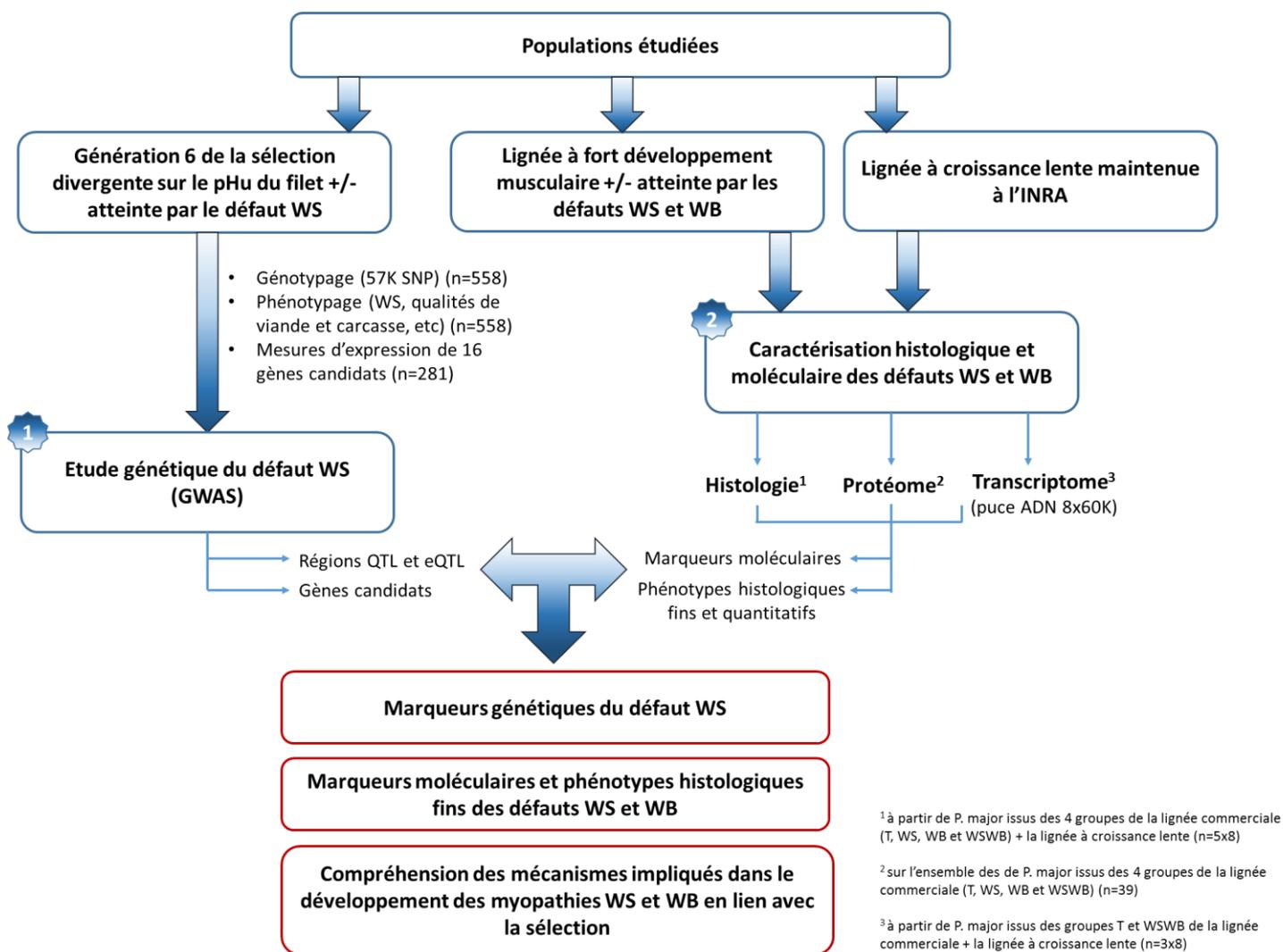


Figure 17 : Organigramme des démarches expérimentales de la thèse

TROISIEME PARTIE :  
ÉTUDE EXPERIMENTALE

---

# Chapitre 1 : Étude génétique du défaut WS

## Cartographie des QTL pour le white-stripping en relation avec le rendement en muscle du filet et les caractéristiques de qualité de la viande chez les poulets de chair - Article 1

Comme décrit précédemment, si les modifications métaboliques et structurales associées aux défauts musculaires sont aujourd'hui mieux comprises, leur contrôle génétique a fait l'objet de peu d'études. Celles-ci ont porté sur l'analyse génétique quantitative des défauts WS et WB et des corrélations génétiques avec le rendement en filet et le poids des animaux (Bailey *et al.*, 2015 ; Alnahhas *et al.*, 2016). La thèse a permis d'aller plus loin dans la compréhension de l'architecture génétique du défaut WS en identifiant des premières régions QTL à l'aide d'une analyse d'association à l'échelle du génome (GWAS). Cette étude a été étendue à d'autres caractères de qualité de viande et de carcasse, tels que le développement musculaire, l'engraissement des animaux, le gras intramusculaire, le pH, ou bien encore les pertes d'eau pour rechercher d'éventuelles co-localisations. Une approche de type eQTL (QTL contrôlant l'expression de gènes) a par la suite été mise en œuvre pour un set de gènes candidats identifiés dans des régions QTL afin d'évaluer leur rôle dans le déterminisme génétique du défaut WS. Le même type d'approche s'est en effet montré efficace par le passé pour l'identification d'un gène puis d'une mutation causale responsable d'une variation de coloration jaune du filet chez le poulet, brevetée en 2011 (Le Bihan-Duval *et al.*, 2011).

Pour cette approche, nous avons mis à profit les deux lignées divergentes de poulets sélectionnés sur le pHu du muscle P. major et qui présentaient le défaut musculaire WS. Environ 50% des animaux de ces lignées présentent le défaut (modéré ou sévère), ce qui en fait un bon modèle d'étude du déterminisme génétique de ce caractère. Au total, 558 animaux de la 6<sup>ème</sup> génération de sélection (278 pHu+, 208 pHu-) ont été génotypés avec la puce poulet Illumina SNP 57K et phénotypés pour le WS, le rendement en filet et plusieurs caractères de qualité de la viande au travers de mesures de pH, de couleur (L\*, a\*, b\*), d'exsudat, de pertes à la cuisson, de texture, de rendement technologique, etc. La détection des QTL a été réalisée en considérant un modèle uni-marqueur (en plus de l'effet polygénique) grâce au logiciel GEMMA. Récemment, il a été montré sur une population pedigree de poulet, structurée comme les lignées

pHu en familles, que ce type de modèle donnait des résultats analogues à ceux d'une analyse multi-marqueurs (avec GS3) ou de type LDLA, en tout cas pour les QTL les plus forts (Le Bihan-Duval *et al.*, 2018).

Malgré un niveau d'héritabilité élevé du WS au sein des lignées pHu (0,65 selon Alnahhas *et al.*, 2016), nous n'avons pas mis en évidence de QTL majeur contrôlant le défaut. En effet, seuls 3 SNP significatifs au niveau du chromosome ont été détectés (sur GGA1, GGA17 et GGA18), allant dans le sens d'un déterminisme polygénique du WS. Malgré une fréquence de WS variable entre les deux lignées, nous n'observons pas de co-localisation entre QTL de défaut et QTL de pHu (pour ces derniers résultats voir Le Bihan-Duval *et al.*, 2018). La détection des QTL intra-lignée montre cependant que si 3 QTL pour le WS sont retrouvés dans la lignée pHu+ (dont ceux sur GGA1 et GGA17), aucun SNP n'a d'effet significatif sur le WS dans la lignée pHu- (cf Figure Additionnelle 1 de l'article). Ces résultats plaident donc en faveur d'une interaction entre le contrôle génétique du WS et le statut métabolique du muscle (au travers notamment des réserves en glycogène du muscle) favorisant ou non l'apparition du défaut.

L'analyse du contenu en gènes des régions QTL identifiées pour le WS nous a permis d'explorer plus avant l'architecture génétique de ce défaut. Elle a conduit à l'identification de 13 gènes candidats à la fois positionnels et fonctionnels. Ils sont impliqués dans la composition des fibres musculaires, de la matrice extracellulaire et du sarcolemme, dans des phénomènes de réparation du muscle, de fibrose et d'adipose ainsi que des dystrophies musculaires chez l'homme. Le niveau d'expression de ces gènes constitue un phénotype quantitatif dont l'architecture génétique peut être précisée grâce à une analyse GWAS. Dans notre cas, cette démarche de détection de eQTL a permis de renforcer l'intérêt de certains gènes candidats dont *LRSAMI* situé sur le chromosome 17 au sein d'un QTL de WS et pour lequel un cis eQTL hautement significatif (à l'échelle du génome) a été détecté. Tel est aussi le cas du gène *MYH1B* pour lequel un cis eQTL est mis en évidence et qui se situe en proximité du QTL de WS sur le chromosome 18.

L'ensemble des résultats décrits dans l'article suivant apporte des résultats originaux sur l'architecture génétique du WS mais aussi des autres indicateurs de qualité étudiés chez le poulet. Ainsi, un total de 42 SNP significatifs associés à ces différents caractères ont été mis en évidence, définissant 18 régions QTL localisées sur 13 chromosomes. L'analyse des phénotypes moléculaires aura quant-à-elle permis d'identifier 132 SNP significatifs définissant 21 régions eQTL localisées sur 16 chromosomes. Concernant le contrôle génétique du WS, cette première approche a identifié les premières régions QTL de WS dont les effets pourront



être explorés au sein d'autres populations. Elle aura également contribué à proposer plusieurs gènes d'intérêt pour une caractérisation moléculaire des défauts.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens

Eva Pampouille<sup>1,2</sup>, Cécile Berri<sup>1</sup>, Simon Boitard<sup>3</sup>, Christelle Hennequet-Antier<sup>1</sup>, Stéphane A. Beauclercq<sup>1</sup>, Estelle Godet<sup>1</sup>, Christophe Praud<sup>1</sup>, Yves Jégo<sup>2</sup> and Elisabeth Le Bihan-Duval<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** White striping (WS) is an emerging muscular defect occurring on breast and thigh muscles of broiler chickens. It is characterized by the presence of white striations parallel to the muscle fibers and has significant consequences for meat quality. The etiology of WS remains poorly understood, even if previous studies demonstrated that the defect prevalence is related to broiler growth and muscle development. Moreover, recent studies showed moderate to high heritability values of WS, which emphasized the role of genetics in the expression of the muscle defect. The aim of this study was to identify the first quantitative trait loci (QTLs) for WS as well as breast muscle yield (BMY) and meat quality traits using a genome-wide association study (GWAS). We took advantage of two divergent lines of chickens selected for meat quality through *Pectoralis major* ultimate pH (pHu) and which exhibit the muscular defect. An expression QTL (eQTL) detection was further performed for some candidate genes, either suggested by GWAS analysis or based on their biological function.

**Results:** Forty-two single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with WS and other meat quality traits were identified. They defined 18 QTL regions located on 13 chromosomes. These results supported a polygenic inheritance of the studied traits and highlighted a few pleiotropic regions. A set of 16 positional and/or functional candidate genes was designed for further eQTL detection. A total of 132 SNPs were associated with molecular phenotypes and defined 21 eQTL regions located on 16 chromosomes. Interestingly, several co-localizations between QTL and eQTL regions were observed which could suggest causative genes and gene networks involved in the variability of meat quality traits and BMY.

**Conclusions:** The QTL mapping carried out in the current study for WS did not support the existence of a major gene, but rather suggested a polygenic inheritance of the defect and of other studied meat quality traits. We identified several candidate genes involved in muscle metabolism and structure and in muscular dystrophies. The eQTL analyses showed that they were part of molecular networks associated with WS and meat quality phenotypes and suggested a few putative causative genes.

**Keywords:** White striping, Meat quality, QTL, eQTL, GWAS, Chicken

\* Correspondence: elisabeth.duval@inra.fr

<sup>1</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

During the past few decades, a notable increase in the demand for poultry meat has been observed due to its convenience for cooking and processing, health benefits, and low price. To meet market demand and the world population increase, producers have had to increase their production while reducing the costs. Consequently, the production of broiler chickens has become more efficient mainly thanks to genetic selection. By comparing two genetic strains representative of the broilers being grown in 1957 or in 2001, Havenstein et al. [1] showed that changes over these 44 years resulted in a 2001 broiler that required approximately one-third the time and over a threefold decrease in the amount of feed consumed to reach the market weight of 1,8 kg. Genetic selection brought about 85% to 90% of the change that has occurred in broiler growth rate [1]. Genetics was also the major contributor to changes in the yield of carcass parts that continued to increase over time especially for breast meat yield which currently exceeds one fifth of the weight of the bird [2, 3]. Nevertheless, for nearly a decade now, the poultry industry in many countries (i.e. Italy, the United States, Brazil, the United Kingdom, Finland, France, etc.) has witnessed an increasing prevalence of broiler breast muscle abnormalities such as WS [4].

WS is characterized by white striations parallel to muscle fibers, mainly on breast, but sometimes on thigh and tender muscle of broilers. Histological observations of white-striped meat indicate an increase in degenerative fibers associated with regeneration phenomenon (nuclear rowing, multiple internationalized nuclei), variation in muscle fiber size, mononuclear cell infiltration, adiposis, and fibrosis [5]. This myopathic pattern has significant consequences for meat quality. WS fillets have a higher fat content and a lower protein content than normal fillets, resulting in meat of reduced nutritional quality [6–10]. They also exhibit higher cooking loss (CL), as a result of a lower water holding capacity (WHC), and reduced tenderness [10–13]. In addition to altering the sensory and technological properties of meat, the severity of WS has negative effects on breast fillet appearance and therefore on consumer purchases [14]. Furthermore, meat affected by breast muscle myopathies can be downgraded or in some cases condemned, leading to serious economic losses. This muscular defect could also result in social acceptability issues regarding animal welfare and meat quality [15].

WS etiology remains poorly understood even if previous studies demonstrated that the prevalence of this defect is directly related to broiler growth performances [6, 11, 16, 17]. Bailey et al. provided the first estimates of genetic parameters of chicken breast muscle myopathies (WS, wooden breast, deep pectoral myopathy) recorded in a high-yielding line or a

moderate-yielding line [18]. WS was the most common myopathy in both chicken lines. It was also the most heritable one, with heritability values ranging from 0.19 to 0.34. Although WS incidence was significantly higher in the high-yielding line than in the moderate-yielding line (49,6% vs 14,5%), the estimated genetic correlations with body weight (BW) and breast muscle yield (BMV) remained low to moderate (0.06 to 0.23) in the two studied lines [18]. The second study conducted by Alnahhas et al. showed a strong genetic basis of WS ( $h^2 = 0.65$ ) measured in two divergent lines of broilers selected for meat quality through *Pectoralis major* pHu [19]. A high genetic correlation between WS and BMV was reported ( $rg = 0.68$ ) while it was moderate with BW [19]. Difference in magnitude of genetic parameters exist between the two studies (related to differences of genetic backgrounds or of methods of estimation), but they both indicate a role of genetic factors in the expression of WS. However, no information is currently available regarding the genomic architecture of this trait.

The aim of this GWAS was to identify QTL for WS as well as BMV and meat quality traits by taking advantage of the two divergent lines of broilers selected for *Pectoralis major* pHu and which exhibit the muscular defect. A previous study showed that there is a higher incidence of WS in line with high pHu value [19]. One hypothesis is that the depletion of glycogen reserves observed in the high pHu line would be a predisposing metabolic environment for WS development.

After the first step of QTL mapping, an eQTL detection was performed for a few positional and/or functional candidate genes. This made it possible to better understand the associated molecular mechanisms, and provided candidate genes and markers that could be used in breeding programs to reduce the prevalence of WS and, more generally, to improve meat quality in broilers.

## Results and discussion

### Descriptive statistics

The descriptive statistics describing the distribution of carcass composition and meat quality traits of the 558 broilers used for the current GWAS are shown in Table 1. A logarithmic transformation was applied to the thiobarbituric acid-reactive substance index (TBA-RS), a marker of lipid peroxidation, in order to normalize its distribution. A  $\chi^2$  homogeneity test was performed to characterize the distribution of normal fillets, fillets that were moderately affected, and fillets severely affected by WS defect between lines (pHu + and pHu-). The proportion of fillets with each degree of WS severity was not the same in both

**Table 1** Means and standard deviation for body composition and meat quality traits measured at 6 weeks

Traits*	Number	pHu +		pHu -	
		Male (N = 135)	Female (N = 143)	Male (N = 118)	Female (N = 162)
BW (g)	558	2990 ± 298	2588 ± 222	2995 ± 327	2631 ± 186
PMY (%)	558	8.45 ± 0.85	8.73 ± 0.67	8.28 ± 0.64	8.36 ± 0.55
PmY (%)	555	1.86 ± 0.15	2.00 ± 0.16	1.83 ± 0.13	1.94 ± 0.12
BMY (%)	555	20.63 ± 1.84	21.46 ± 1.43	20.21 ± 1.43	20.61 ± 1.24
TY (%)	556	23.08 ± 1.31	22.40 ± 1.13	22.67 ± 1.13	22.10 ± 0.97
AFP (%)	556	1.73 ± 0.34	2.06 ± 0.38	1.70 ± 0.31	2.03 ± 0.34
L*	556	44.98 ± 3.90	44.75 ± 3.41	53.09 ± 2.91	52.65 ± 3.10
a*	556	-0.28 ± 0.61	-0.19 ± 0.64	0.03 ± 0.63	0.06 ± 0.49
b*	554	10.79 ± 1.37	10.72 ± 1.28	12.84 ± 1.20	12.70 ± 1.10
DL (%)	558	2.14 ± 1.52	1.91 ± 1.08	4.42 ± 1.49	4.19 ± 1.40
CL (%)	555	9.40 ± 2.40	8.80 ± 1.81	11.19 ± 2.18	10.34 ± 1.76
CCY (%)	536	85.81 ± 3.86	86.73 ± 3.36	83.26 ± 4.10	83.72 ± 4.10
SF (N/cm <sup>2</sup> )	556	11.44 ± 2.14	10.85 ± 2.08	16.44 ± 2.78	15.77 ± 2.77
IFP (%)	555	1.54 ± 0.47	1.37 ± 0.37	1.58 ± 0.39	1.33 ± 0.35
TBA-RS	554	0.35 ± 0.42	0.28 ± 0.34	0.57 ± 0.42	0.45 ± 0.37
WS (%)	557	61.5	73.4	42.7	42.6

\*BW body weight, PMY Pectoralis major yield, PmY Pectoralis minor yield, BMY breast meat yield, TY thigh yield, AFP abdominal fat percentage, L\* lightness, a\* redness, b\* yellowness, DL drip loss, CL cooking losses, CCY curing-cooking yield, SF shear force, IFP intramuscular fat content, TBA-RS thiobarbituric acid-reactive substance, WS white striping

lines ( $p = 2.6 \times 10^{-15}$ ). There was a higher proportion of normal fillets in the pHu- line than in the pHu + line (57.3% vs 32.4%, respectively) and incidence of severe WS was higher in the pHu + line than in the pHu- line (27.7% vs 4.3%, respectively) ( $p = 7.5 \times 10^{-16}$ ).

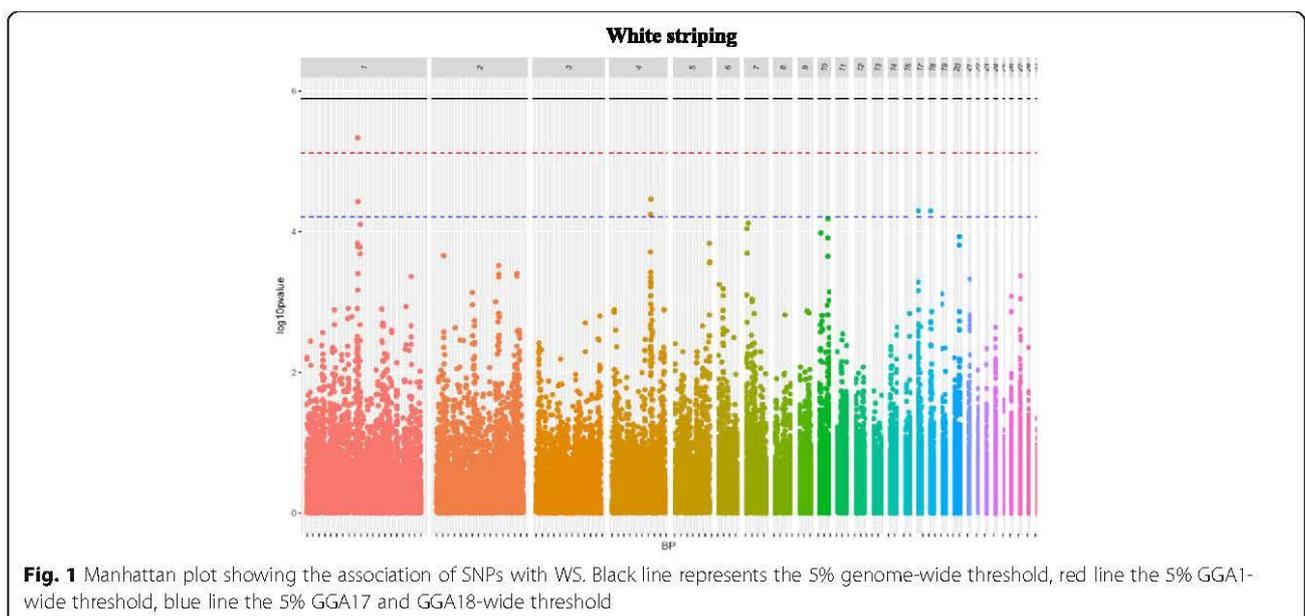
These results are in agreement with previous studies reporting that meat with myopathy is often

characterized by a higher pHu value than normal meat [11, 12, 19–22].

**QTL detection**

**White striping**

The GWAS performed on the whole population created from the two divergent lines identified three SNPs that



were significantly associated with WS at the chromosome level and located on GGA1, GGA17, and GGA18 (Fig. 1, Table 2). This finding was not in favor of a monogenic inheritance of WS since several QTLs seemed to be involved in addition to the polygenic effect included in the model (see Methods section). Moreover, no co-localization with SNPs previously identified for pHu in the same genetic population was observed [23], which is not in favor of common genetic variants between the two traits. In order to explore whether pHu could indirectly influence WS, intra-line QTL detection of WS was performed (Additional file 1: Figure S1). No significant SNPs were detected in the pHu- line, while eight SNPs were significant at the chromosome threshold in the pHu + line (Table 3). They confirmed the two regions previously detected on GGA1 and GGA17 in the entire population and identified a new one on GGA20. The SNP identified with the lowest *p*-value was also the most significant SNP associated with WS in the entire population (Gga\_rs13899127 on GGA1). Five SNPs significant at the GGA1 threshold co-localized with this SNP. Furthermore, we recovered the same SNP on GGA17 as the one associated with WS in the entire population (Gga\_rs15804842).

For this SNP, the minor allele frequency (MAF) was similar in both lines (MAF = 0.446 and MAF = 0.478 in the pHu + and pHu- lines, respectively), but the SNP effect was higher in the pHu + line than in the pHu- line ( $\beta = -3.2 \times 10^{-1}$  and  $\beta = -6.5 \times 10^{-2}$ , respectively). This illustrated that unless no co-localization was observed between WS and pHu QTLs, there might be an interaction between the genetic control of WS and the metabolic and physiological status of the two lines.

#### Body composition and meat quality traits

Three SNPs were significant at the genome threshold, while 39 SNPs were significant at the chromosome level for body composition and meat quality traits (Table 2). These SNPs were mostly associated with CL and drip loss (DL), color parameters, and *Pectoralis major* and *minor* yields (PMY and PmY, respectively). They defined 15 QTL regions distributed over 11 chromosomes. As for WS, these results strongly suggested a polygenic inheritance of the studied carcass and meat quality parameters.

More than one third of the detected SNPs were located on GGA4 and defined two QTL regions (QTL3, QTL4). The first one (QTL3) was defined by a unique SNP (GGaluGA263381 at 65.97 Mb) which controlled both PMY and BMY. Interestingly, this SNP was also close to significance for WS ( $p = 3.5 \times 10^{-5}$ , not shown in the table). The second one (QTL4) (90.82 to 91.20 Mb) contained three genome-wide significant SNPs for CL as well as several chromosome-wide

**Table 2** Significant SNPs for white striping, body composition, and meat quality traits

Traits <sup>a</sup>	QTL <sup>b</sup>	GGA	SNP ID	Position <sup>c</sup>	P-value <sup>d</sup>
L*	QTL1	1	Gga_rs13841646	26,417,615	$7.27 \times 10^{-6}$
L*	QTL1	1	GGaluGA009377	26,433,696	$7.27 \times 10^{-6}$
L*	QTL1	1	Gga_rs15215403	26,454,554	$7.27 \times 10^{-6}$
WS	QTL2	1	Gga_rs13899127	87,535,862	$4.62 \times 10^{-6}$
PMY	QTL3	4	GGaluGA263381	65,974,471	$6.96 \times 10^{-6}$
BMY	QTL3	4	GGaluGA263381	65,974,471	$9.13 \times 10^{-6}$
CL	QTL4	4	Gga_rs16454334	90,828,977	$8.38 \times 10^{-6}$
CL	QTL4	4	GGaluGA271193	90,877,143	$1.39 \times 10^{-6}$
CL	QTL4	4	GGaluGA271212	90,940,405	$7.30 \times 10^{-6}$
CL	QTL4	4	GGaluGA271252	91,016,447	$1.12 \times 10^{-5}$
CL	QTL4	4	Gga_rs13776465	91,056,759	$6.05 \times 10^{-6}$
CL	QTL4	4	Gga_rs16454745	91,098,157	<b><math>1.02 \times 10^{-8}</math></b>
DL	QTL4	4	Gga_rs16454745	91,098,157	$5.15 \times 10^{-6}$
L*	QTL4	4	Gga_rs16454745	91,098,157	$9.01 \times 10^{-6}$
b*	QTL4	4	Gga_rs16454745	91,098,157	$1.59 \times 10^{-5}$
CL	QTL4	4	Gga_rs14506759	91,113,465	<b><math>2.27 \times 10^{-7}</math></b>
DL	QTL4	4	Gga_rs14506759	91,113,465	$2.32 \times 10^{-6}$
L*	QTL4	4	Gga_rs14506759	91,113,465	$5.51 \times 10^{-6}$
b*	QTL4	4	Gga_rs14506759	91,113,465	$1.17 \times 10^{-5}$
CL	QTL4	4	Gga_rs15648179	91,195,923	<b><math>1.76 \times 10^{-9}</math></b>
DL	QTL4	4	Gga_rs15648179	91,195,923	$1.70 \times 10^{-6}$
PMY	QTL5	5	Gga_rs14515278	11,832,057	$1.99 \times 10^{-5}$
DL	QTL6	5	Gga_rs13794130	20,549,458	$1.64 \times 10^{-6}$
DL	QTL6	5	GGaluGA278338	20,902,598	$1.81 \times 10^{-5}$
CL	QTL6	5	Gga_rs16475257	20,970,166	$7.14 \times 10^{-6}$
PmY	QTL7	5	GGaluGA289933	53,765,237	$1.23 \times 10^{-5}$
SF	QTL8	5	Gga_rs14554568	56,426,990	$2.26 \times 10^{-5}$
PMY	QTL9	8	GGaluGA333125	28,864,644	$1.79 \times 10^{-5}$
a*	QTL10	12	Gga_rs14032735	3,153,630	$3.59 \times 10^{-5}$
a*	QTL10	12	Gga_rs14033649	3,956,551	$3.67 \times 10^{-5}$
b*	QTL11	14	GGaluGA101062	5,003,931	$5.36 \times 10^{-5}$
WS	QTL12	17	Gga_rs15804842	2,376,482	$5.07 \times 10^{-5}$
WS	QTL13	18	Gga_rs14108368	2,766,387	$5.02 \times 10^{-5}$
PmY	QTL14	19	Gga_rs14115815	1,020,966	$5.39 \times 10^{-5}$
PmY	QTL14	19	Gga_rs15044017	1,037,551	$5.64 \times 10^{-5}$
DL	QTL15	24	Gga_rs16197733	4,335,811	$1.58 \times 10^{-5}$
b*	QTL15	24	Gga_rs16197733	4,335,811	$6.12 \times 10^{-5}$
a*	QTL16	25	Gga_rs15561568	1,745,235	$1.14 \times 10^{-4}$
a*	QTL16	25	GGaluGA194453	1,793,966	$6.68 \times 10^{-5}$
a*	QTL16	25	Gga_rs16741571	2,129,327	$4.12 \times 10^{-5}$
CCY	QTL17	26	GGaluGA197797	4,554,077	$5.24 \times 10^{-5}$
b*	QTL18	27	Gga_rs16205408	2,040,050	$1.08 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup>L\* lightness, WS white striping, PMY *Pectoralis major* yield, BMY breast meat yield, CL cooking losses, DL drip loss, b\* yellowness, PmY *Pectoralis minor* yield, SF shear force, a\* redness, CCY curing-cooking yield

<sup>b</sup>Name of the QTL region

<sup>c</sup>Positions are indicated on galgal5 assembly

<sup>d</sup>Genome-wide significant *P*-values are indicated in bold

**Table 3** Significant SNPs for white striping in the pHu + line

GGA	SNP ID	Position <sup>a</sup>	P-value
1	Gga_rs13899127	87,535,862	$1.33 \times 10^{-6}$
1	Gga_rs13899410	87,752,766	$2.20 \times 10^{-6}$
1	GGaluGA030724	87,760,003	$2.20 \times 10^{-6}$
1	Gga_rs14856166	88,384,404	$2.98 \times 10^{-6}$
1	Gga_rs13900230	88,416,292	$2.98 \times 10^{-6}$
1	Gga_rs13900307	88,438,949	$2.98 \times 10^{-6}$
17	Gga_rs15804842	2,376,482	$1.11 \times 10^{-5}$
20	Gga_rs15177428	10,347,742	$2.78 \times 10^{-5}$

<sup>a</sup> Positions are indicated on galgal5 assembly

significant SNPs for DL, lightness (L\*) and yellowness (b\*) of the meat. There were two common SNPs between DL, CL, L\* and b\* (Gga\_rs1654745 at 91.09 Mb and Gga\_rs14506759 at 91.11 Mb) and one more common SNP between CL and DL at 91.20 Mb (Gga\_rs15648179). As illustrated in Fig. 2, the QTL4 region appeared to be a pleiotropic region controlling both the WHC (through DL and CL), and the meat color (through L\* and b\*). Although strong genetic correlations have already been reported between these parameters and the meat pHu in chickens [24, 25], no QTL for pHu was found nearby [23]. Similarly, we did not observe any co-localization with QTL of WS, which can also impair WHC and meat color [11].

Two additional pleiotropic regions were evidenced (QTL6, QTL15), one for DL and CL on GGA5 (20.55 to 20.97 Mb), and the other, for DL and b\* on GGA24 (4.33 Mb).

A significant positive genetic relationship between WS and intramuscular fat content (IMF) had previously been reported in this population [19], suggesting that IMF could be a useful quantitative predictor of WS. However, no significant SNPs were detected for IMF in the current study, maybe because this trait was controlled by many genes with too small effects. In the same way, no QTLs were found for the measurements of TBA-RS index, a marker of lipid peroxidation.

### Identification of candidate genes

#### WS phenotype

Identification of genomic regions involved in the control of WS is an opportunity to improve our understanding of the molecular mechanisms underlying the appearance of this defect. For that, we looked for candidate genes within several regions of interest. They comprised the three significant WS-QTL regions (on GGA1, GGA17, and GGA18), the GGA4 region for which a pleiotropic effect with BMY was suggested, and two additional suggestive regions for which SNPs (Gga\_rs16576992 at 4.51 Mb on GGA7 and GGaluGA071697 at 16.43 Mb

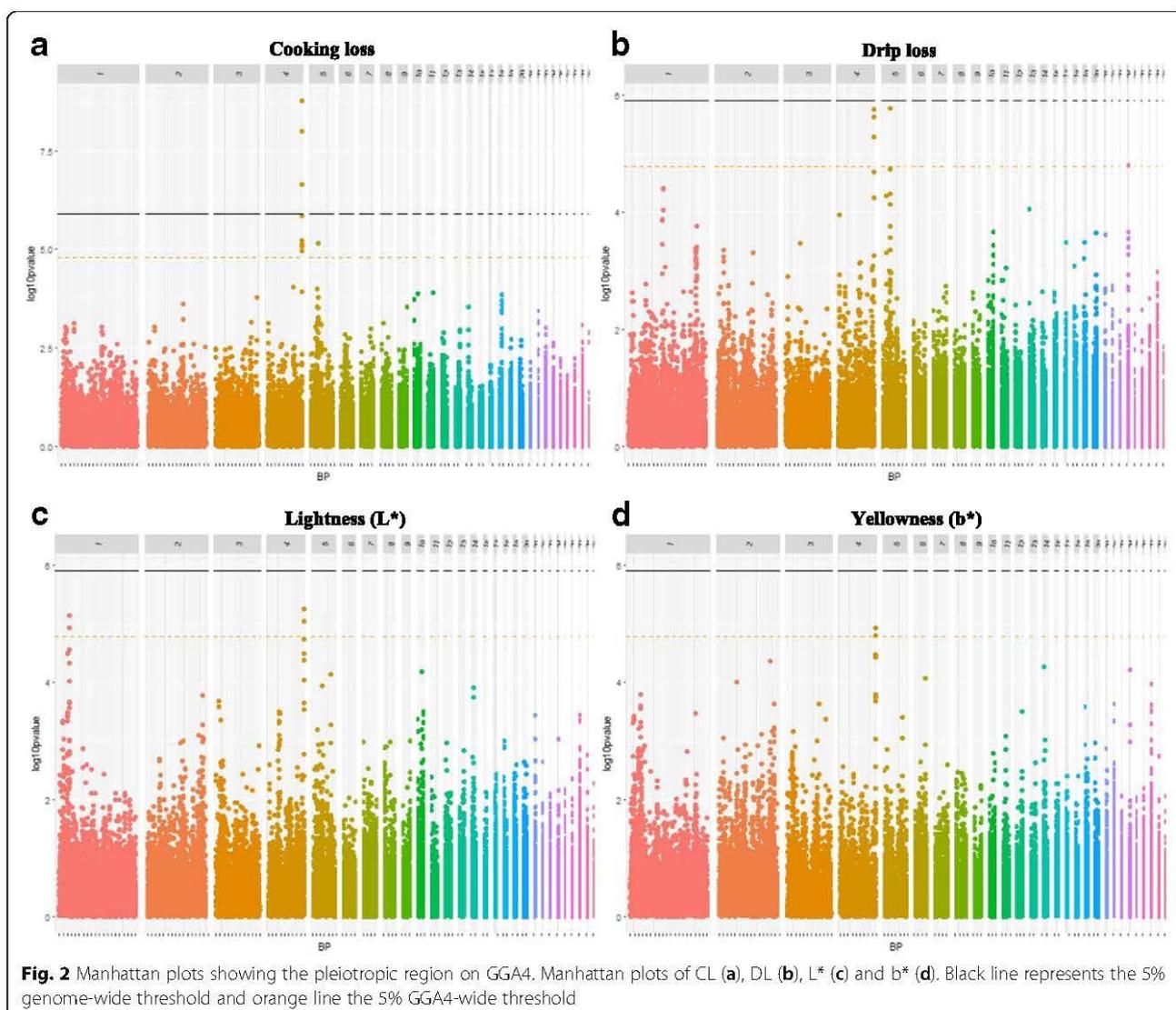
on GGA10) close to significance were detected ( $p = 7.52 \times 10^{-5}$  and  $6.60 \times 10^{-5}$  respectively).

Using an R software package (Gviz) [26], we visualized the gene environment around these different regions of interest (Additional file 2: Figure S2, Additional file 3: Figure S3, Additional file 4: Figure S4, Additional file 5: Figure S5 and Additional file 6: Figure S6). Potential candidate genes were selected based on their proximity with a significant SNP and/or their biological function (Table 4). Most of the selected genes are involved in muscular structure and processes related to muscle fiber regeneration and repair (i.e., *MYH15*, *MYH1E*, *MYH1B*, *MYH1F*, *MYH13*, *MYOCD*), adiposis and fibrosis (*PDGFR $\alpha$* ), extracellular matrix or sarcolemma composition (i.e., *COL6A3*, *FNI*, *SGCB*), muscle metabolism (*PNPLA7*), and human neuromuscular disorders (i.e., *FNI*, *COL6A3*, *SGCB*, *LRSAM1*).

The *Myosin Heavy chain 15* gene (*MYH15*) located in the region of interest on GGA1 (Additional file 2: Figure S2) is involved in the contraction, development, and regeneration of avian skeletal muscles [27]. The most significant SNP associated with WS is located in the gene itself.

The *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha* gene (*PDGFR $\alpha$* ), which is located upstream of the SNP of interest for WS and BMY on GGA4 (Additional file 3: Figure S3), is known to be a marker of fibro-adipogenic precursors (FAPs) recently characterized as playing a role in muscle regeneration and repair. Under pathological conditions like muscular dystrophy, FAPs differentiate into fibroblasts and adipocytes, leading to fat and connective tissue infiltration. In addition, FAPs promote myoblast differentiation in co-cultivation experiments [28]. The *Sarcoglycan Beta* gene (*SGCB*) is another gene of interest for the GGA4 region (Additional file 3: Figure S3) as it codes for the beta sarcoglycan protein, a member of the sarcoglycan complex located to the sarcolemma. This subcomplex of the dystrophin-associated glycoprotein complex (DAG complex) contributes to muscle tissue structure maintenance and stability and transfer of mechanical strength all along the sarcolemma during muscle contraction. Mutations in this gene were identified in human limb-girdle (LGMD1E) muscular dystrophy [29]. It has been shown that transgenic beta-sarcoglycan-deficient mice exhibited progressive muscular dystrophy with extensive degeneration and regeneration of muscle fibers [30]. These mice also exhibited muscular hypertrophy and whitish stripes within the muscles [30]. This makes *SGCB* an interesting positional and functional candidate gene for the QTL3 region, for which a pleiotropic effect on WS and BMY was suggested.

The *Fibronectin 1* gene (*FNI*) is the closest gene to the WS QTL region on GGA7 (Additional file 4: Figure S4)



and encodes a glycoprotein, which contributes to the creation of fibers and extracellular matrix during tissue repair after degeneration. In addition, an increase in fibronectin levels is a biomarker of Duchenne muscular dystrophy [31]. The *Collagen type VI Alpha 3-chain* gene (*COL6A3*) is another interesting gene for this region (Additional file 4: Figure S4). It produces collagen molecules found in the extracellular matrix and surrounding cells that make up the muscles used for movement. Mutations in this gene are associated with Bethlem myopathy and Ullrich congenital myopathy [32].

One candidate gene in the region of interest on GGA17 (Additional file 5: Figure S5) is the *Leucine-rich Repeat and Sterile Alpha Motif containing 1* gene (*LRSAM1*). It encodes an ubiquitin-protein ligase with a role in sorting internalized cell-surface receptor proteins. Mutations in the *LRSAM1* gene have been shown to cause an axonal form of Charcot-Marie-Tooth hereditary

neuropathy (CMT2P), characterized by progressive muscle weakness and atrophy [33]. A second candidate gene, *Patatin-like Phospholipase domain containing 7* gene (*PNPLA7*), is an insulin-regulated lysophospholipase expressed in muscle and fat. The regulation of its expression by nutritional status and insulin suggests a role in the catabolism of lipid precursors and/or mediators that affect energy metabolism in mammals [34]. Furthermore, another member of the patatin family, *PNPLA2*, is involved in neutral lipid storage disease associated with myopathy that is characterized by the accumulation of triglycerides in multiple tissues [35]. The last candidate gene of this region, *Tubulin Beta-4B chain* (*TUBB4B*), codes for a protein (tubulin) which is the major constituent of microtubules. Microtubules are major constituents of the cytoskeleton and have major roles in maintenance of the cell structure and intracellular transport.

**Table 4** Set of genes selected for eQTL detection

Trait	Candidate gene	Name	Gene ID	GGA	Start <sup>a</sup>	End <sup>a</sup>
WS	<i>MYH15</i>	myosin heavy chain 15	395,534	1	87,501,148	87,547,719
WS	<i>PDGFRα</i>	platelet derived growth factor receptor alpha	395,509	4	65,808,218	65,842,682
WS	<i>SGCB</i>	sarcoglycan β	422,760	4	66,587,612	66,593,633
WS	<i>FN1</i>	fibronectin 1	396,133	7	4,389,536	4,439,464
WS	<i>COL6A3</i>	collagen type VI alpha 3 chain	396,548	7	4,808,221	4,861,524
WS	<i>LRSAM1</i>	leucine-rich repeat and sterile alpha motif containing 1	417,265	17	2,026,150	2,051,581
WS	<i>PNPLA7</i>	patatin-like phospholipase domain containing 7	427,774	17	2,080,356	2,196,812
WS	<i>TUBB4B</i>	tubulin beta 4B class Ib	417,255	17	2,368,202	2,370,299
WS	<i>MYH1E</i>	myosin heavy chain 1E	427,788	18	588,354	611,030
WS	<i>MYH1B</i>	myosin heavy chain 1B	374,069	18	633,783	651,055
WS	<i>MYH1F</i>	myosin heavy chain 1F	768,566	18	431,376	449,075
WS	<i>MYH13</i>	myosin heavy chain 13	8735	18	346,675	384,341
WS	<i>MYOCD</i>	myocardin	427,790	18	830,396	930,411
CL, DL, L*,b*	<i>DYSF</i>	dysferlin	425,353	4	91,211,949	91,279,004
CL, DL, L*,b*	<i>CAV3</i>	caveolin 3	378,796	12	19,314,666	19,318,095
CL, DL, L*,b*	<i>CAPN3</i>	calpain 3	423,233	5	25,645,486	25,673,883

<sup>a</sup> Positions are indicated on galgal5 assembly

Finally, in addition to *MYH15* on GGA1, four fast myosin heavy chain isoforms (i.e. *MYH1E*, *MYH1B*, *MYH1F*, and *MYH13*) and myocardin (*MYOCD*) were selected. As shown in Additional file 6: Figure S6, these genes are grouped within a cluster located at the beginning of GGA18 (0.35 to 0.93 Mb), near the QTL region associated with WS (2.77 Mb). Out of all the groups of myosins, we chose to focus on them because they are fairly well annotated. Furthermore, a previous histological study on the same genetic lines highlighted a greater expression of embryonic (*MYH1B*) and neonatal (*MYH1F*) myosin heavy chain isoforms and a lower expression of adult myosin heavy chain (*MYH1E*) in the pHu+ than in the pHu- muscle, which is consistent with a stronger muscle fiber regeneration process [36]. In addition, a transcriptomic study on the same model showed differential expression of *MYH13* and *MYOCD* genes between normal and WS fillets [37].

#### Other meat quality phenotypes

Because of its high level of significance and pleiotropic effect on CL, DL, L\* and b\*, we looked for candidate genes within the QTL4 region (Table 2). Visualization of the gene environment showed that the *dysferlin* (*DYSF*) gene (91.21–91.27 Mb) is close to the QTL region (90.82 to 91.20 Mb) (Additional file 7: Figure S7). The *dysferlin* gene encodes a protein that is found in the sarcolemma. It is involved in sarcolemma repair and some results suggest that dysferlin may also be involved in the formation of new muscle fibers (regeneration) and inflammation [38]. Furthermore, dysferlin was identified as

a gene that is mutated in limb-girdle muscular dystrophy and some congenital myopathies. Some studies demonstrated that dysferlin-null mice developed progressive muscular dystrophy caused by failure of plasma membrane repair in muscle [38, 39]. Two genes encoding for skeletal muscle proteins (i.e. *caveolin 3* and *calpain 3*) were added to the set of genes of interest both for their interaction with the *dysferlin* gene [40, 41], and their involvement in human limb-girdle muscular dystrophies (LGMD1C and LGMD2A, respectively) [42, 43]. *Caveolin 3* (*CAV3*) may play a key role in the fusion of myoblasts into myotubes during the maturation process of muscle fibers. *Calpain 3* (*CAPN3*) is an intracellular protease specific to the muscle, involved in the calcium-dependent proteolytic system. They are known to catalyze the limited proteolysis of proteins (i.e., desmin and vimentin) involved in cytoskeletal modelling or signal transduction and to play a role in regeneration processes [44, 45].

Of the 16 candidate genes considered in the study, whether for WS or meat quality phenotypes, more than half are components of the extracellular matrix, sarcolemma, or muscles. Interestingly, several of them (i.e., *COL6A3*, *CAV3*, *CAPN3*, *DYSF*, *SGCB*) are associated with, or are members of the dystrophin complex. This complex contains dystrophin, which is at the origin of the genetic defect causing Duchenne muscular dystrophy (DMD) in humans, and establishes a direct link between the actin cytoskeleton and the extracellular matrix [46]. Thus, it participates in maintaining the extracellular matrix and sarcolemma. A perturbation within this



complex or these associated proteins, such as a loss of the mechanical link between the cytoskeleton, extracellular matrix, and sarcolemma, may result in muscle fragility, contraction-induced damage, and necrosis [47].

#### eQTL detection

GWAS can be applied in order to map eQTLs that control the transcript level of genes. Co-localization between phenotypic QTLs and eQTLs is particularly useful in order to identify candidate genes, which are potentially causative [48]. In the current study, the expression of all identified candidate genes was quantified using RT-qPCR. After GWAS analysis, 132 SNPs were found to be significantly associated with molecular phenotypes including 24 SNPs significant at the genome threshold (Additional file 8: Table S1). They defined 21 eQTL regions located on 16 chromosomes.

eQTLs are categorized as *cis* or *trans*, where *cis* eQTLs represent a polymorphism physically located near the gene itself, for example, a promoter polymorphism that gives rise to differential expression of the gene [48]. In the current study, we defined as *cis* eQTLs, SNPs that were within 1 Mb of the annotated start or stop site of the corresponding structural gene. eQTLs that did not fulfill this condition were considered to be *trans* eQTLs. These regions could, for example, contain a polymorphism in a transcription factor that correspondingly modulates the level of transcripts for target genes [48]. Of the 21 eQTL regions, three were *cis* eQTLs and 18 were *trans* eQTLs.

#### *Cis* eQTLs

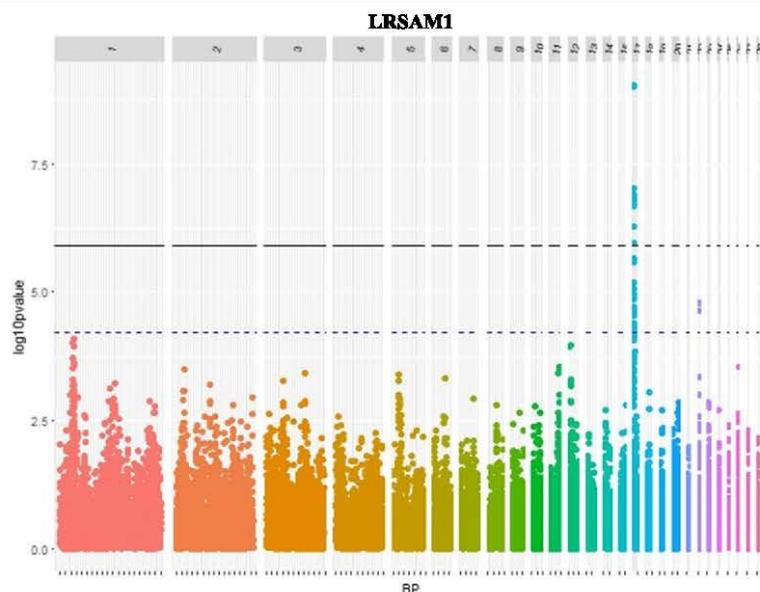
The first *cis* eQTL relates to *LRSAM1* gene. Out of 31 significant SNPs associated with its expression, 28 were located in a region close to the gene (eQTL15) and one was in the gene itself (Gga\_rs15034052 at 2.04 Mb). Eleven out of these 29 SNPs were significant at the genome threshold (Fig. 3, Additional file 8: Table S1).

The second *cis* eQTL relates to *MYH1F* gene. Of the 16 SNPs significantly associated with its expression, two were significant at the genome threshold on GGA18 (Additional file 9: Figure S8, Additional file 8: Table S1). The expression of *MYH1F* is associated with 14 SNPs, which are close to the gene (eQTL16) and located within a region containing the cluster of myosin heavy chain isoforms.

The last *cis* eQTL relates to *CAV3* gene. GWAS analysis identified 29 SNPs significantly associated with gene expression and which defined two eQTL regions, one *cis* eQTL on GGA12 (eQTL13) (Additional file 10: Figure S9) and one *trans* eQTL on GGA18 (eQTL17) (Additional file 8: Table S1). In contrast to the two other *cis* eQTLs, the *CAV3* *cis* eQTL was significant only at the chromosome level.

#### *Trans* eQTLs

Among all *trans* eQTLs (Additional file 8: Table S1), four regions seem to control several molecular phenotypes. The first one is on GGA2 (eQTL3), where a single SNP is associated with the expression of *PNPLA7* and *DYSF* genes (Gga\_rs14139566 at 12.55 Mb). The second, on GGA6 (eQTL9), includes several SNPs for the *MYH1B* gene, and one single SNP for *MYH1B*, *DYSF*



**Fig. 3** Manhattan plot showing the association of SNPs with *LRSAM1* expression. Black line represents the 5% genome-wide threshold and blue line the 5% GGA17-wide threshold

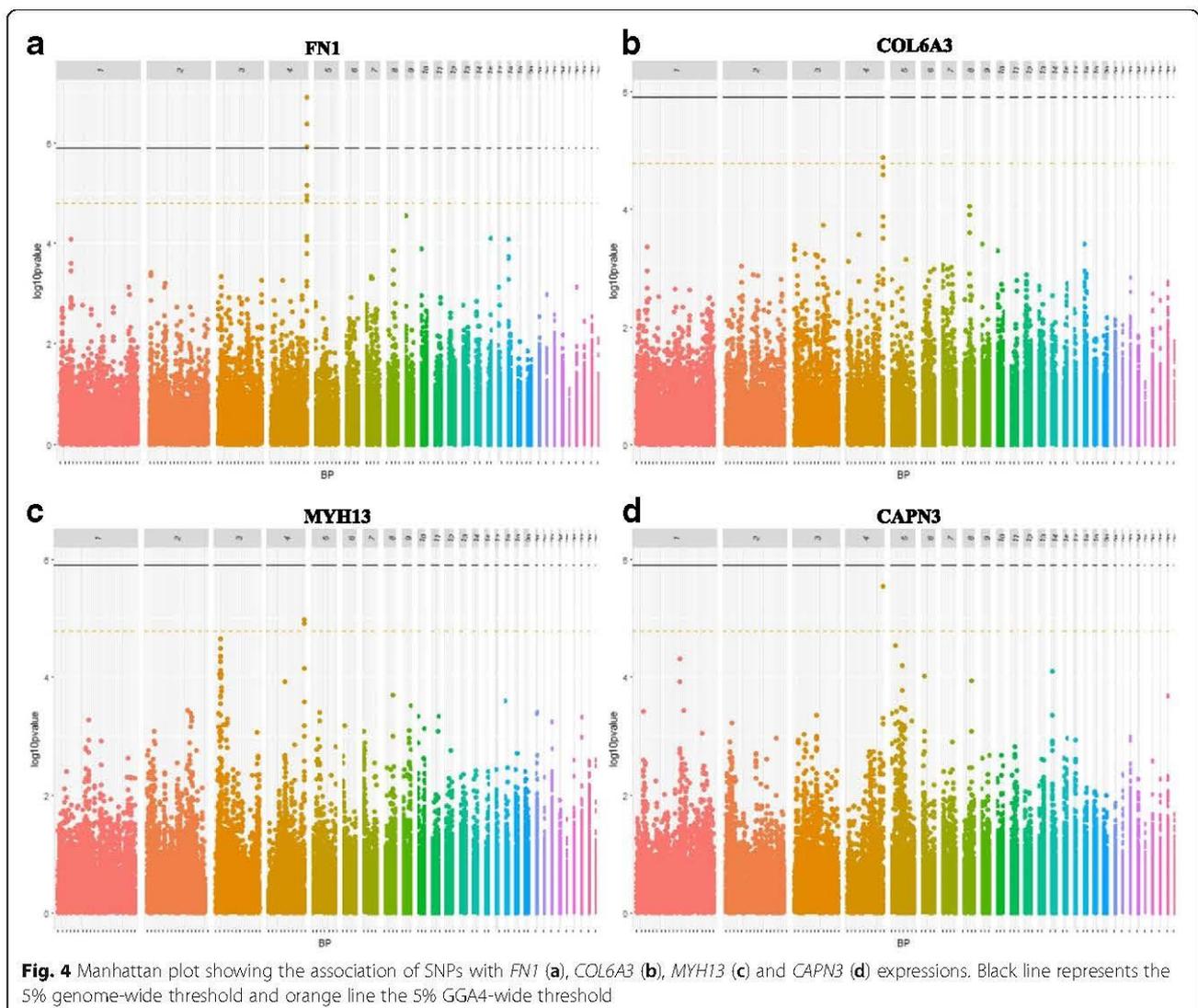
and *PDGFR $\alpha$*  (Gga\_rs14581613 at 2.03 Mb). The third region is located on GGA22 (eQTL18) where two single SNPs are identified (GGaluGA186934 at 2.90 Mb and GGaluGA186952 at 2.94 Mb), for *LRSAM1*, *PNPLA7* and *TUBB4B* gene expression. Finally, one last region appears to control several molecular phenotypes on GGA4 (eQTL6). This region is associated with the expression of *FN1*, *MYH13*, *COL6A3*, and *CAPN3*. Of the six SNPs significantly associated with these molecular phenotypes, half are associated with at least two gene expressions: one single SNP between *FN1* and *MYH13* (Gga\_rs16454745 at 91.10 Mb), another between *FN1* and *COL6A3* (Gga\_rs14506759 at 91.11 Mb), and finally a last between the four genes (Gga\_rs15648179 and 91.20 Mb) (Fig. 4). This last region seems particularly interesting since it regulates the expression of three genes involved in human muscle diseases, as a biological marker (*FN1*) or genetic markers (*COL6A3* and *CAPN3*).

#### Co-localization between QTLs and eQTLs

Interestingly, several co-localizations between QTL and eQTL regions were observed on GGA4, GGA5, and GGA17, which could suggest causative genes and gene networks involved in the variability of meat quality traits or breast meat yield.

#### White striping

The first co-localization concerns the region of GGA17 associated with both the expression of *LRSAM1* gene and WS defect (eQTL15 and QTL12) (Additional file 8: Table S1, Additional file 11: Table S2). The level of significance was much higher for the molecular phenotype than for the WS phenotype, which suggested a tighter regulation of the gene expression by this region. Although three genes of interest (*LRSAM1*, *PNPLA7*, *TUBB4B*) were tested for this region, only *LRSAM1* was significantly regulated and appeared to be a putative



causative gene. In addition to being a positional and expressional candidate gene, *LRSAM1* is also a functional candidate gene, since a mutation in this gene results in a form of hereditary motor and sensory neuropathy where slowly progressive distal muscle weakness and atrophy were observed [33].

A *cis* eQTL for the neonatal myosin heavy chain form *MYH1F* (0.30 to 0.83 Mb) was also observed near the QTL associated with WS on the region of interest on GGA18 (2.77 Mb). Embryonic (*MYH1B*) and neonatal (*MYH1F*) forms of myosin heavy chain are found in breast muscle during its early development or in muscle fibers regeneration. A characterization of the muscle fibers was previously performed in the pHu+ and pHu- lines. The muscle fibers of the pHu+ birds were characterized by a higher number of cells expressing the developmental embryonic and neonatal isoforms of the fast myosin heavy chain [36], as well as a higher incidence of WS than was found in pHu- muscle fibers [19]. *MYH1F* could be an interesting molecular marker of WS in relation to the regeneration process. However, we cannot conclude that there is a single mutation affecting this molecular phenotype and WS, since the positions of the QTL and eQTL were rather distant.

#### Body composition and meat quality traits

A first co-localization was found on GGA5 between PMY QTL (QTL5) and *SGCB*-eQTL (eQTL7) (Additional file 8: Table S1, Additional file 11: Table S2). As previously reported, mutations within this gene result in a loss or a large decrease in the sarcoglycan complex [30]. Mice carrying the mutation are hypertrophic and larger than wild-type phenotypes. No significant SNP for WS was found in this region in the current study, which did not support any role of the region in the genetic relationship observed between PMY and WS in this population [19]. Nevertheless, our results indicated that *SGCB* could be an interesting molecular actor to consider in future studies on the control of muscle development and integrity.

Another co-localization was found on GGA4, between the previously identified pleiotropic region (QTL4) containing the SNPs strongly associated with CL, DL, and color parameters ( $L^*$  and  $b^*$ ), and the eQTL region controlling *FNI*, *COL6A3*, *MYH13*, and *CAPN3* expression (eQTL6). This region seems to regulate meat quality phenotypes possibly related to muscle cell integrity and expression of genes involved in human neuromuscular disorders, as well as in the structure and composition of muscle fibers.

The QTL mapping revealed several regions of importance for the control of meat quality phenotypes. The eQTL analysis suggested some candidate genes and molecular networks associated with WS and meat

quality traits. On the other hand, the eQTL analysis for *MYH15*, *SGCB*, and *DYSF* did not evidence any co-localizations with WS nor with meat quality traits. However, we cannot exclude an effect of these genes. They remain interesting candidate genes whose action could be modulated by mutations in the coding region, leading to variations in protein stability or enzymatic activity, or by post-translation modification [48]. This was the case for the *RN* gene (Rendement Napole) in pigs where a loss of function mutation in the *PRKAG3* gene is associated with an excess of glycogen content in the skeletal muscles [49]; or for the *MSTN* gene (myostatin), for which a loss of function mutation results in muscular hypertrophy in cattle and sheep [50]. Further analyses are needed to elucidate the role of these genes in the initiation of biological processes involved in the appearance of WS defect and more generally in poultry meat quality variations.

#### Conclusions

This study reported the first QTLs for WS in chicken. It did not support the existence of a major gene, but was in favor of a polygenic inheritance of the defect and of the other studied meat quality traits. We identified several candidate genes involved in muscle metabolism and structure, and also in neuromuscular disorders for some of them. The eQTL analyses confirmed that they were part of molecular networks associated with WS and meat quality phenotypes and suggested a few putative causative genes. This study provides a first set of molecular and genetic markers for WS that will have to be validated and enriched by the study of additional genetic populations and the integration of molecular and genetic information.

#### Methods

##### Birds and housing

Meat pHu reflects the level of muscle glycogen content and is a determining criterion of meat quality. In this study we used two broiler lines divergently selected for *Pectoralis major* pHu according to a breeding scheme described in Alnahhas et al. [25] and which exhibit WS defect.

WS, body composition, and meat quality traits were evaluated in 558 birds (253 males and 305 females) from the 6th generation of divergent selection (G6). Of this total, 278 broilers (135 males and 143 females) were from the pHu+ line (selected for high breast pHu value) and 280 broilers (118 males and 162 females) from the pHu- line (selected for low breast pHu value). Birds were reared as a single population (males and females from both lines), following standard rearing practices and had ad libitum access to feed and water. They were produced in two successive batches and slaughtered at 6 weeks of age at the PEAT experimental unit (INRA, Centre Val de Loire, Nouzilly, France). After hanging the birds on the

processing chain, they were automatically stunned in a water bath using a constant electric current and slaughtered manually by cutting the carotid artery and the jugular vein at the ventral surface of the neck from inside the oral cavity. Samples of *P. major* were collected fifteen minutes after slaughter, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Breasts were visually graded a day after slaughter by one trained person. The categories of WS were defined according to a modified version of the scale of Kuttappan et al. [14] to account for the lower degree of severity in our experimental population (0 = normal, absence of WS, 1 = moderate white striping, corresponding to striation thickness  $\leq 1$  mm, and 2 = severe occurrence of white striping, corresponding to striation thickness  $\geq 1$  mm). Body composition was characterized for all birds through the measurement of BMV, abdominal fat percentage (AFP), PMY, PmY and thigh yield (TY) expressed in relation to body weight (BW). Breast meat quality was evaluated on *Pectoralis major* muscle through the measurement of color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), CL, DL, Warner-Bratzler shear force (SF) of cooked meat, curing-cooking yield (CCY), IMF, and TBA-RS index. All these measurements were realized as described in Alnahhas et al. [19].

### Genotyping

The 558 birds were genotyped at Labogena Laboratory (Jouy en Josas, France) using the Illumina chicken SNP 57 K Beadchip containing 57,636 SNPs. Quality control of the genotype data was performed using PLINK 1.9 and included animal call rate ( $>95\%$ ), SNP call rate ( $>95\%$ ), and minor allele frequency ( $>5\%$ ). Finally, after filters, all animals were kept and 40,195 out of 57,636 SNPs distributed along 28 autosomal chromosomes were validated for further analyses.

### Gene expression

Gene expression was determined by RT-qPCR performed on one batch of animals from the 6th generation of divergent selection (145 pHu+, 136 pHu-), as described by Beauclercq et al. [36]. Total RNA was extracted from *Pectoralis major* muscle sampled for each individual, using RNA NOW (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Ten  $\mu\text{g}$  of RNA from each sample were reverse-transcribed using RNase H<sup>-</sup>MMLV reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, Illkirch, France) and random primers (Promega, Charbonnières les Bains, France). Primers targeting the studied genes were designed with Primer3 version 4.0.0 [51, 52]. The list of primer sequences is available in Additional file 11: Table S2. Their products of amplification were analyzed by electrophoresis and further sequenced.

The level of mRNA expression of candidate genes was quantified using a Fluidigm Biomark microfluidic device (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) according to the manufacturer's protocol (ADP37). Because *MYH15* and *PDGFR $\alpha$*  genes were added to the list of candidate genes later, their expression was quantified by RT-qPCR using a Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) and the Takyon<sup>®</sup> (Eurogentec, Liege, Belgium), according to the manufacturer's recommendations. Quantitative PCR conditions were set at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by forty-five cycles of 10 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , 20 s at  $60^{\circ}\text{C}$  and 10 s at  $72^{\circ}\text{C}$ . Two references were used: *PDE3B* (phosphodiesterase 3B), which is invariant whatever the sex and degree of severity of WS within and between the lines, was used as the housekeeping gene to normalize the Ct values; and a mix of chicken *Pectoralis major* muscle cDNA. The calculation of absolute mRNA levels was based on the PCR efficiency and the threshold cycle (CT) deviation of an unknown cDNA versus the control cDNA according to the equation proposed by Pfaffl [53]. The normalized Ct values ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) were used as the molecular phenotype for the GWAS analyses.

### QTL and eQTL detections

Genome-wide association studies were performed on classical and molecular phenotypes using an univariate linear mixed model (LMM) implemented in GEMMA (Genome-wide Efficient Mixed Model Association) software [54]. The model used for analyses was:

$$y = W\alpha + x\beta + u + \epsilon,$$

where  $y$  is a  $n$ -vector of phenotypes for  $n$  individuals,  $W$  the  $n \times c$  matrix of covariates which contains fixed effects of sex and batch (only sex effect for eQTL detection) and including a column of 1 s for the general mean,  $\alpha$  the  $c$ -vector of the corresponding coefficients including the intercept,  $x$  the  $n$ -vector of marker genotypes,  $\beta$  a  $p$ -vector of marker effects,  $u$  the  $n$  vector of polygenic effects, and  $\epsilon$  the  $n$ -vector of the residuals.  $u$  follows a multivariate normal distribution:  $u \sim \text{MVN}_n(0, \lambda\tau^{-1}K)$  where  $\tau^{-1}$  is the variance of the residual errors,  $\lambda$  is the ratio between the genetic variance (variance explained by the SNPs) and the residual variance, and  $K$  is a known  $n \times n$  relationship matrix estimated from genotypes, using a  $n \times p$  matrix of genotypes ( $X$ ):

$$K = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p (x_i - 1_n \bar{x}_i)(x_i - 1_n \bar{x}_i)^T.$$

This expression was used to calculate  $K$  where  $x_i$  is the  $i$ th column representing genotypes of  $i$ th SNP,  $\bar{x}_i$  is the sample mean and  $1_n$  is a  $n \times 1$  vector of 1's.  $\epsilon$  follows

a multivariate normal distribution:  $\epsilon \sim \text{MVN}_n(0, \tau^{-1} \mathbf{I}_n)$  where  $\mathbf{I}_n$  is an  $n \times n$  identity matrix.

To control the family-wise error rate (FWER) in the context of multiple hypothesis testing, a Bonferroni correction at 0.05 significant level was applied for both genome-wide and chromosome-wide thresholds (significant level =  $\alpha$ /number of SNPs). Any SNP with a  $P$ -value  $< 1.21 \times 10^{-6}$  was considered to be significantly associated at the genome-wide threshold. The chromosome-wide significance thresholds ranged from  $7.56 \times 10^{-6}$  to  $3.36 \times 10^{-4}$ , depending on the chromosome size.

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Manhattan plot showing the association of SNPs with WS in the pHu+ (a) and the pHu- (b) line. Black line represents the 5% genome-wide threshold, red line the 5% GGA1-wide threshold, blue line the 5% GGA17-wide threshold and purple line the 5% GGA20-wide threshold. (DOCX 1204 kb)

**Additional file 2: Figure S2.** Gene environment of the region of interest for WS on GGA1. The first track corresponds to the chromosome 1 where the region of interest is indicated by a red line. The second track corresponds to the genomic axis for the region of interest. The third track corresponds to the gene model based on GalGal5 assembly. The last track corresponds to the Manhattan plot of the region of interest where the orange line represents the chromosome threshold and the most significant SNP for WS is highlighted in red. (PDF 8 kb)

**Additional file 3: Figure S3.** Gene environment of the region of interest for WS and BMV on GGA4. The first track corresponds to the chromosome 4 where the region of interest is indicated by a red box. The second track corresponds to the genomic axis for the region of interest. The third track corresponds to the gene model based on GalGal5 assembly. The two last tracks correspond to the Manhattan plot of BMV and WS respectively, on the region of interest, where the orange line represents the chromosome threshold and the most significant SNP for WS and BMV is highlighted in red. (PDF 10 kb)

**Additional file 4: Figure S4.** Gene environment of the region of interest for WS on GGA7. The first track corresponds to the chromosome 7 where the region of interest is indicated by a red box. The second track corresponds to the genomic axis for the region of interest. The third track corresponds to the gene model based on GalGal5 assembly. The last track corresponds to the Manhattan plot of the region of interest where the orange line represents the chromosome threshold and the most significant SNP is highlighted in red. (PDF 8 kb)

**Additional file 5: Figure S5.** Gene environment of the region of interest for WS on GGA17. The first track corresponds to the chromosome 17 where the region of interest is indicated by a red box. The second track corresponds to the genomic axis for the region of interest. The third track corresponds to the gene model based on GalGal5 assembly. The last track corresponds to the Manhattan plot of the region of interest where the orange line represents the chromosome threshold and the most significant SNP is highlighted in red. (PDF 9 kb)

**Additional file 6: Figure S6.** Gene environment of the region of interest for WS on GGA18. The first track corresponds to the chromosome 18 where the region of interest is indicated by a red box. The second track corresponds to the genomic axis for the region of interest. The third track corresponds to the gene model based on GalGal5 assembly. The last track corresponds to the Manhattan plot of the region of interest where the orange line represents the chromosome threshold and the most significant SNP is highlighted in red. (PDF 10 kb)

**Additional file 7: Figure S7.** Gene environment of the pleiotropic region on GGA4. The first track corresponds to the chromosome 4 where the region of interest is indicated by a red box. The second track

corresponds to the genomic axis for the region of interest. The third track corresponds to the gene model based on GalGal5 assembly. The last track corresponds to the Manhattan plot of CL, which has the most significant SNP in the pleiotropic region. Orange line represents the chromosome threshold and the most significant SNP is highlighted in red. (PDF 9 kb)

**Additional file 8: Table S1.** Significant SNPs for the level of expression of the 16 candidate genes. (DOCX 36 kb)

**Additional file 9: Figure S8.** Manhattan plot showing the association of SNPs with *MYH1F* expression. Black line represents the 5% genome-wide threshold and blue line the 5% GGA18-wide threshold. (DOCX 560 kb)

**Additional file 10: Figure S9.** Manhattan plot showing the association of SNPs with *CAV3* expression. Black line represents the 5% genome-wide threshold and green line the 5% GGA12-wide threshold. (DOCX 585 kb)

**Additional file 11: Table S2.** Primer sequences of the 16 candidate genes and the housekeeping gene (*PDE3B*). (DOCX 14 kb)

## Acknowledgements

We thank LABOGENA laboratory for the genotyping analyses. We thank the staff of the poultry breeding facilities (PEAT, INRA, 37380, Nouzilly, France) and of the Avian Research Unit (URA, INRA, 37380, Nouzilly, France) for their technical assistance.

## Funding

The selection program was funded by INRA. Phenotyping and genotyping of the birds used for QTL detection was funded by the RFI CASDAR program no. 1309 OPTIMIANDE supported by the French Ministry of Agriculture. This funding body had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data, or in writing the manuscript.

## Availability of data and materials

All the data that support the conclusions of the study are included in the paper and additional files.

## Authors' contributions

ELBD, CB, and YJ are at the origin of the conception of the program and defined the experimental design. ELBD and CB supervised the phenotyping. EP was in charge of QTL and eQTL detection analyses, under the supervision of ELBD, CHA, and SB. CHA and SB contributed to the choice of tools and methodologies used for GWAS analysis. SAB, EG, and EP designed and tested the oligonucleotide primers used for quantitative RT-qPCR analysis. EG and SAB performed RNA extraction. CP and CB supervised the identification of functional candidate genes within QTL regions. EP drafted the first version of the manuscript under the supervision of ELBD. All the authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval

All the procedures needed for the reproduction and phenotyping of the two lines (described under program 00880.02) were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation in Val de Loire (registered under N° 19 by the National Committee). No permissions were required for the collection of the two studied chicken lines owned by INRA.

## Consent for publication

Not applicable

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France. <sup>2</sup>Hubbard SAS, 22800 Mauguérand, Le Foëil-Quintin, France. <sup>3</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT, 31320 Castanet Tolosan, France.

Received: 1 December 2017 Accepted: 13 March 2018  
Published online: 20 March 2018

## References

- Havenstein GB, Ferket PR, Qureshi MA. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci.* 2003;82(10):1500–8.
- Havenstein GB, Ferket PR, Qureshi MA. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci.* 2003;82(10):1509–18.
- Petracci M, Mudalal S, Soglia F, Cavani C. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *World's Poultry Science Journal.* 2015;71:363–73.
- Kuttappan VA, Hargis BM, Owens CM. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. *Poult Sci.* 2016;95(11):2724–33.
- Kuttappan VA, Shivaprasad HL, Shaw DP, Valentine BA, Hargis BM, Clark FD, McKee SR, Owens CM. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poult Sci.* 2013;92(2):331–8.
- Kuttappan VA, Brewer VB, Apple JK, Waldroup PW, Owens CM. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci.* 2012;91(10):2677–85.
- Kuttappan VA, Goodgame SD, Bradley CD, Mauromoustakos A, Hargis BM, Waldroup PW, Owens CM. Effect of different levels of dietary vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopherol acetate) on the occurrence of various degrees of white striping on broiler breast fillets. *Poult Sci.* 2012;91(12):3230–5.
- Kuttappan VA, Huff GR, Huff WE, Hargis BM, Apple JK, Coon C, Owens CM. Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poult Sci.* 2013;92(2):339–45.
- Petracci M, Mudalal S, Babini E, Cavani C. Effect of white striping on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. *Ital J Anim Sci.* 2014;13(3138):179–83.
- Mudalal S, Babini E, Cavani C, Petracci M. Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by white striping. *Poult Sci.* 2014;93(8):2108–16.
- Petracci M, Mudalal S, Bonfiglio A, Cavani C. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poult Sci.* 2013;92(6):1670–5.
- Mudalal S, Lorenzi M, Soglia F, Cavani C, Petracci M. Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal.* 2015;9(4):728–34.
- Tijare W, Yang FL, Kuttappan VA, Alvarado CZ, Coon CN, Owens CM. Meat quality of broiler breast fillets with white striping and woody breast muscle myopathies. *Poult Sci.* 2016;95(9):2167–73.
- Kuttappan VA, Lee YS, Erf GF, Meullenet JF, McKee SR, Owens CM. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poult Sci.* 2012;91(5):1240–7.
- Lorenzi M, Mudalal S, Cavani C, Petracci M. Incidence of white striping under commercial conditions in medium and heavy broiler chickens in Italy. *J Appl Poult Res.* 2014;23:754–8.
- Kuttappan VA, Brewer VB, Mauromoustakos A, McKee SR, Emmert JL, Meullenet JF, Owens CM. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci.* 2013;92(3):811–9.
- Russo E, Drigo M, Longoni C, Pezzotti R, Fasoli P, Recordati C. Evaluation of white striping prevalence and predisposing factors in broilers at slaughter. *Poult Sci.* 2015;94(8):1843–8.
- Bailey RA, Watson KA, Bilgili SF, Avendano S. The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. *Poult Sci.* 2015;94(12):2870–9.
- Alnahhas N, Berri C, Chabault M, Chartrin P, Boulay M, Bourin MC, Le Bihan-Duval E. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genet.* 2016;17:61.
- Dalle Zotte A, Cecchinato M, Quartesan A, Bradanovic J, Tasoniero G, Puolanne E. How does "wooden breast" myodegeneration affect poultry meat quality? *60th International Congress of Meat Sci Technol.* 2014:476–9.
- Bowker B, Zhuang H. Impact of white striping on functionality attributes of broiler breast meat. *Poult Sci.* 2016;95(8):1957–65.
- Tasoniero G, Cullere M, Cecchinato M, Puolanne E, Dalle Zotte A. Technological quality, mineral profile, and sensory attributes of broiler chicken breasts affected by white striping and wooden breast myopathies. *Poult Sci.* 2016;95(11):2707–14.
- Le Bihan-Duval E, Hennequet-Antier C, Berri C, Beauclercq S, Bourin M, Boulay M, Demeure O, Boitard S. Identification of genomic regions and candidate genes for chicken meat ultimate pH by combined detection of selective sweeps and QTL. *BMC Genomics* 2017.
- Le Bihan-Duval E, Debut M, Berri CM, Sellier N, Sante-Lhoutellier V, Jégo Y, Beaumont C. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genet.* 2008;9:53.
- Alnahhas N, Berri C, Boulay M, Baéza E, Jégo Y, Baumard Y, Chabault M, Le Bihan-Duval E. Selecting broiler chickens for ultimate pH of breast muscle: analysis of divergent selection experiment and phenotypic consequences on meat quality, growth, and body composition traits. *J Anim Sci.* 2014;92(9):3816–24.
- Hahne F. The Gviz User Guide. <https://bioconductor.org/packages/development/vignettes/Gviz/inst/doc/Gviz.pdf> 2014.
- Camoretti-Mercado B, Dizon E, Jakovcic S, Zak R. Differential expression of ventricular-like myosin heavy chain mRNA in developing and regenerating avian skeletal muscles. *Cell Mol Biol Res.* 1993;39(5):425–437.
- Joe AW, Yi L, Natarajan A, Grand FL, So L, Wang J, Rudnicki MA, Rossi FM. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* 2010;12:153–63.
- Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, et al. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet.* 1995;11(3):257–65.
- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 1999;8(9):1589–98.
- Cynthia Martin F, Hiller M, Spitali P, Onk S, Dalebout H, Palmblad M, Chaouch A, Guglieri M, Straub V, Lochmuller H, et al. Fibronectin is a serum biomarker for Duchenne muscular dystrophy. *Proteomics Clin Appl.* 2014;8(3–4):269–78.
- Bertini E, Pepe G. Collagen type VI and related disorders: Bethlem myopathy and Ullrich scleroatonic muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002;6(4):193–8.
- Guernsey DL, Jiang H, Bedard K, Evans SC, Ferguson M, Matsuoka M, Macgillivray C, Nightingale M, Perry S, Rideout AL, et al. Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *PLoS Genet.* 2010;6(8).
- Kienesberger PC, Lass A, Preiss-Landl K, Wolinski H, Kohlwein SD, Zimmermann R, Zechner R. Identification of an insulin-regulated lysophospholipase with homology to neuropathy target esterase. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5908–17.
- Schweiger M, Lass A, Zimmermann R, Eichmann TO, Zechner R. Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(2):E289–96.
- Beauclercq S, Hennequet-Antier C, Praud C, Godet E, Collin A, Tesseraud S, Metayer-Coustard S, Bourin M, Moroldo M, Martins F, et al. Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. *Sci Rep.* 2017;7(1):6447.
- Berri C, Petracci M. Poultry quality evaluation, 1st. EDN. 2017;
- Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 2003;423(6936):168–72.
- Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S, Raffelsberger T, Maerk I, Hoger H, Jung M, et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet.* 1999;23(2):141–2.
- Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2001;10(17):1761–6.
- Huang Y, Verheesen P, Roussis A, Frankhuizen W, Ginjaar I, Haldane F, Laval S, Anderson LV, Verrips T, Frants RR, et al. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(6):721–30.

42. Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*. 1995;81(1):27–40.
43. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati M, et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998;18(4):365–8.
44. Dargelos E, Poussard S, Brule C, Daury L, Cottin P. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie*. 2008;90(2):359–68.
45. Sorimachi H, Ono Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc Res*. 2012;96(1):11–22.
46. Arvanitidis A, Henriksen K, Karsdal MA, Nedergaard A. Neo-epitope peptides as biomarkers of disease progression for muscular dystrophies and other myopathies. *Journal of Neuromuscular Diseases*. 2016;3:333–46.
47. Spence HJ, Chen YJ, Winder SJ. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. *BioEssays*. 2002;24(6):542–52.
48. Hansen BG, Halkier BA, Kliebenstein DJ. Identifying the molecular basis of QTLs: eQTLs add a new dimension. *Trends Plant Sci*. 2008;13(2):72–7.
49. Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Iannuccelli N, Rask L, et al. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*. 2000;288(5469):1248–51.
50. Bellinge RH, Liberles DA, Iaschi SP, O'Brien PA, Tay GK. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim Genet*. 2005;36(1):1–6.
51. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1289–91.
52. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3–new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e115.
53. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
54. Zhou X, Stephens M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat Genet*. 2012;44(7):821–4.

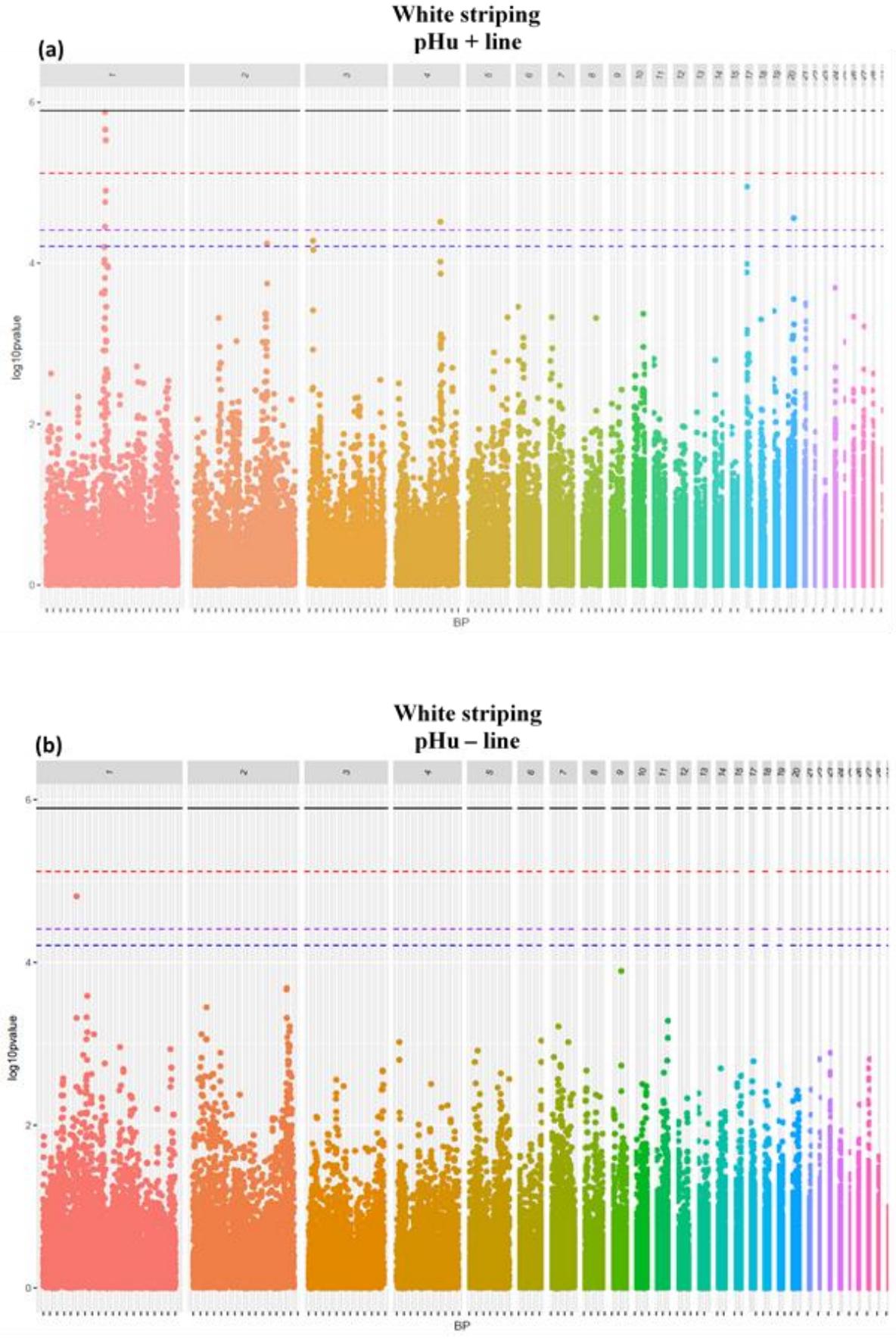
Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

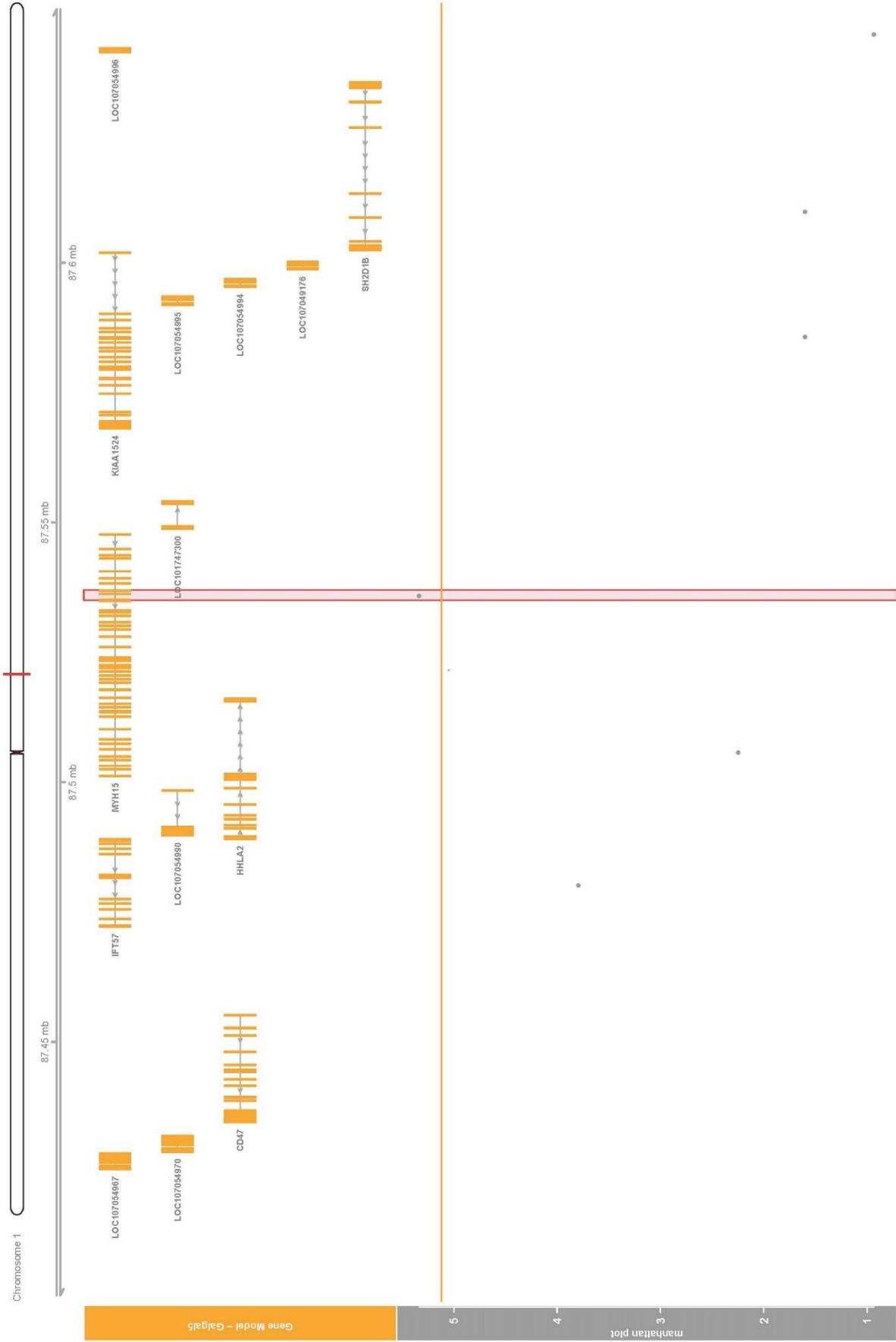


Additional file 1: Figure S1.

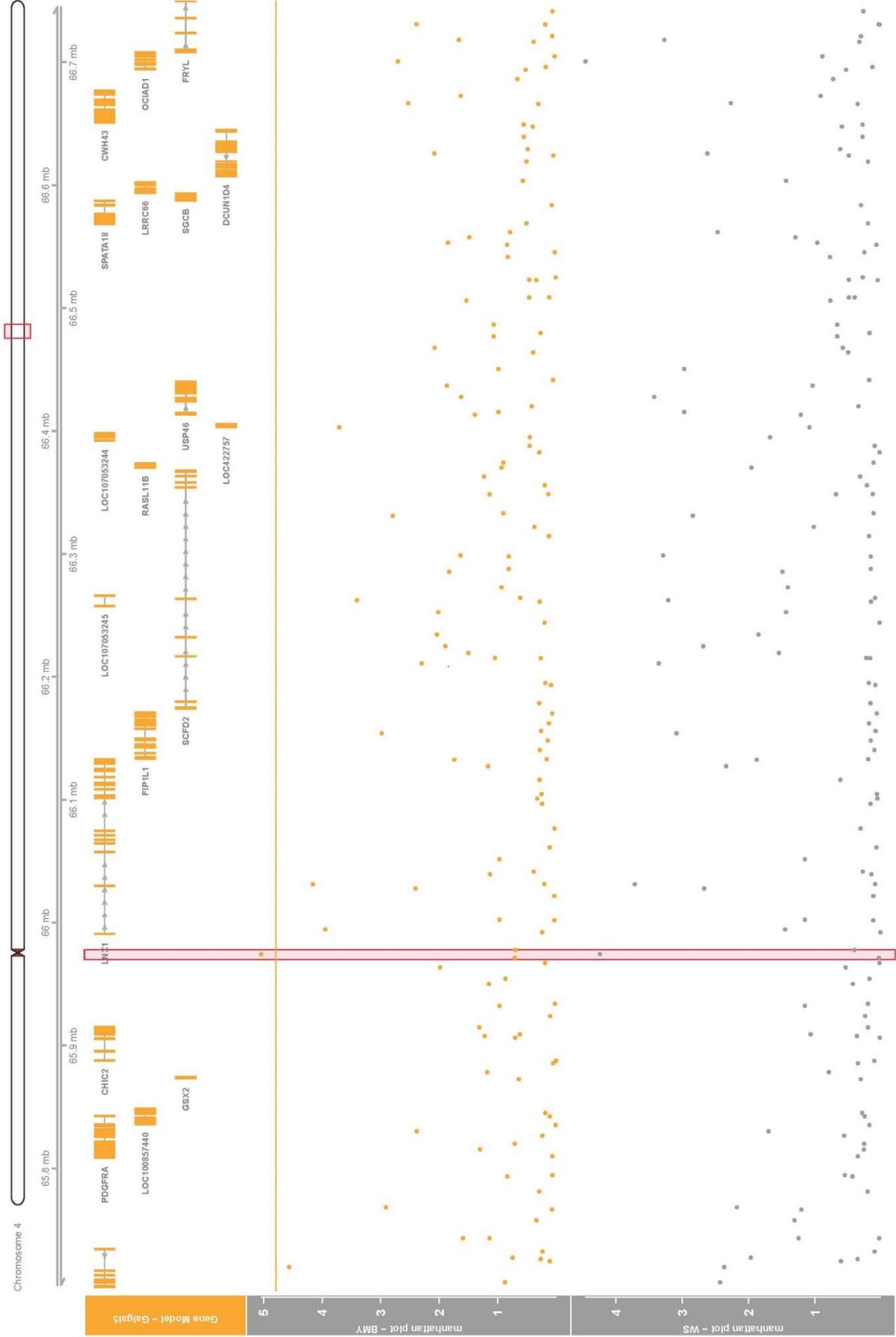




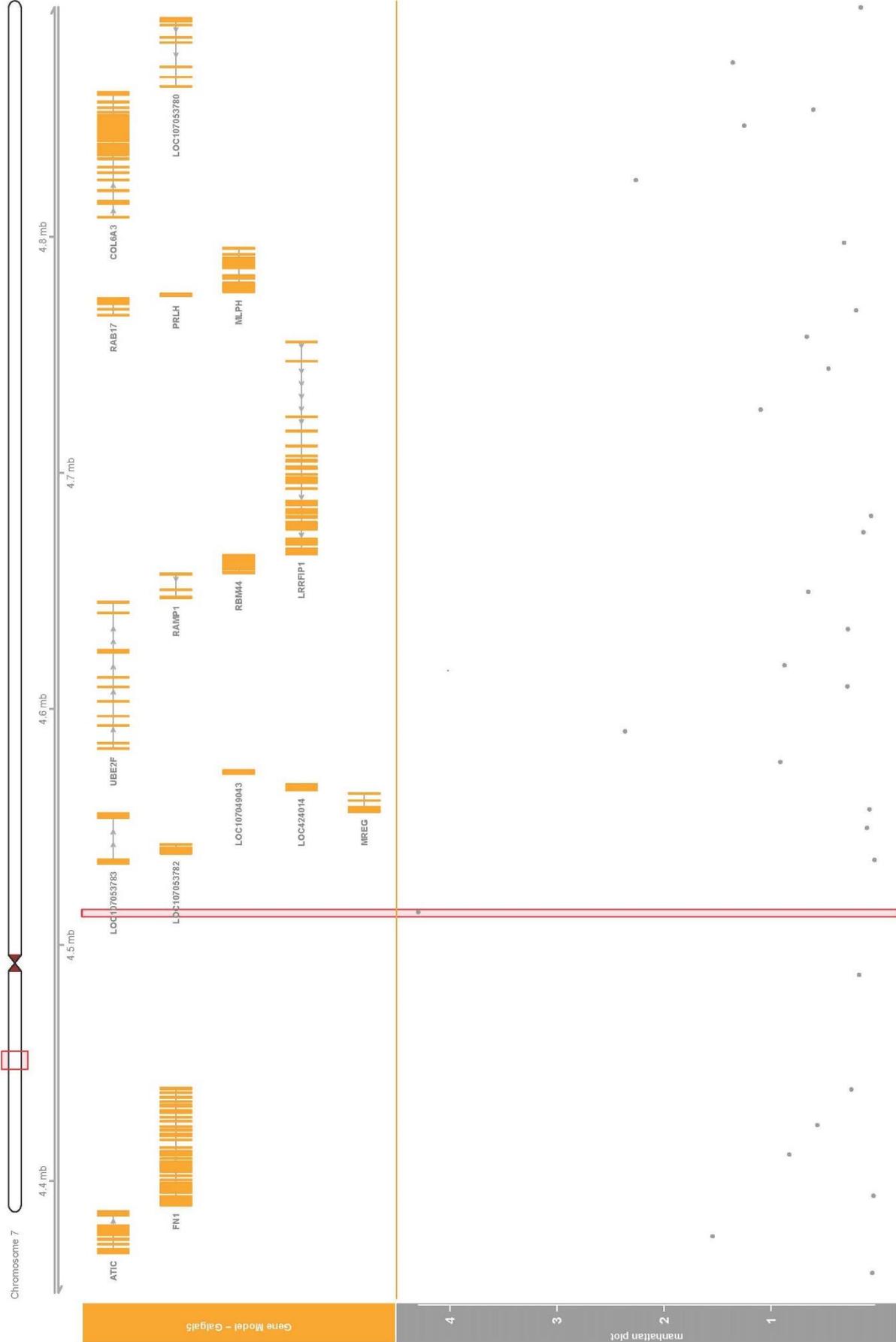
Additional file 2: Figure S2.



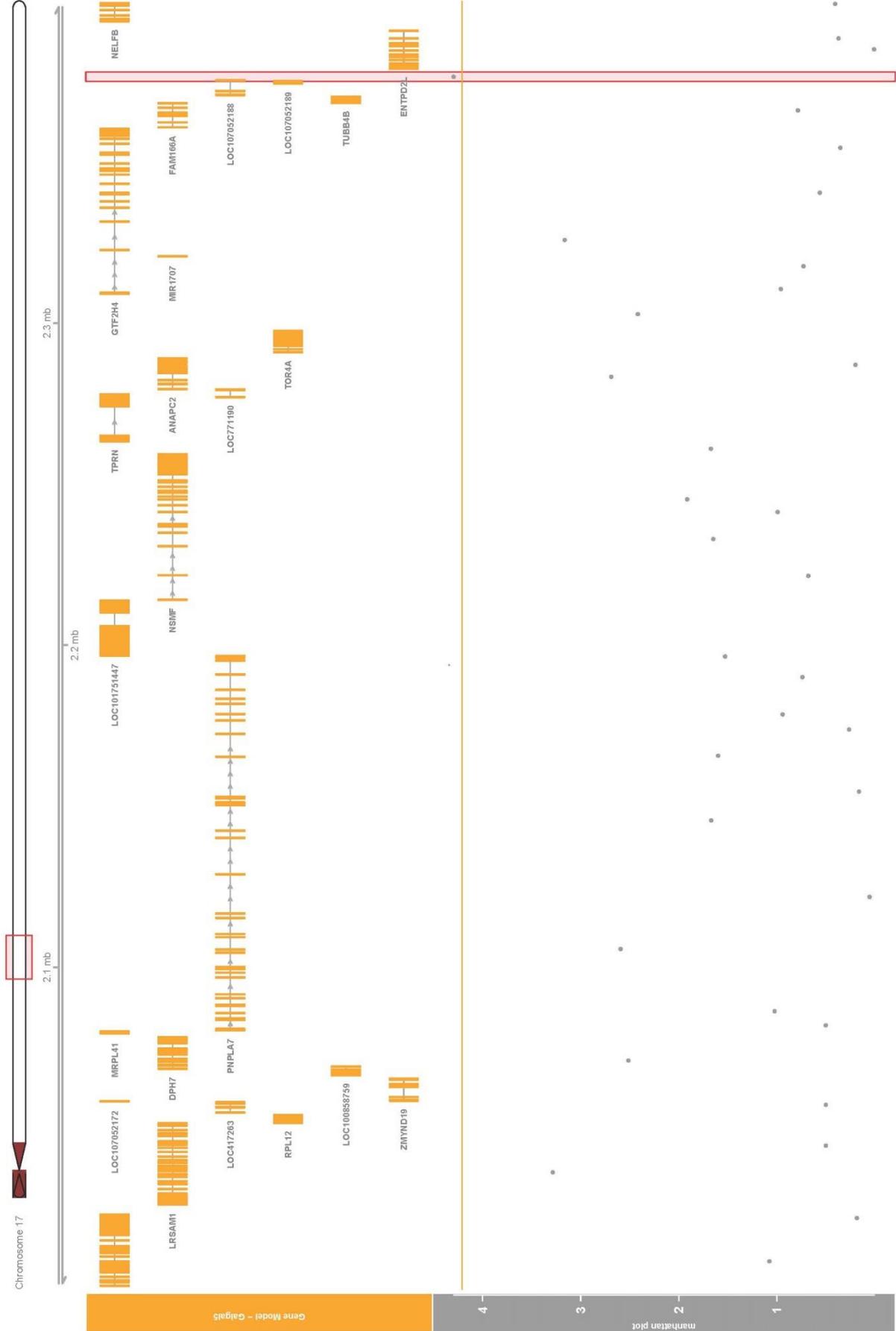
**Additional file 3: Figure S3.**



Additional file 4: Figure S4.

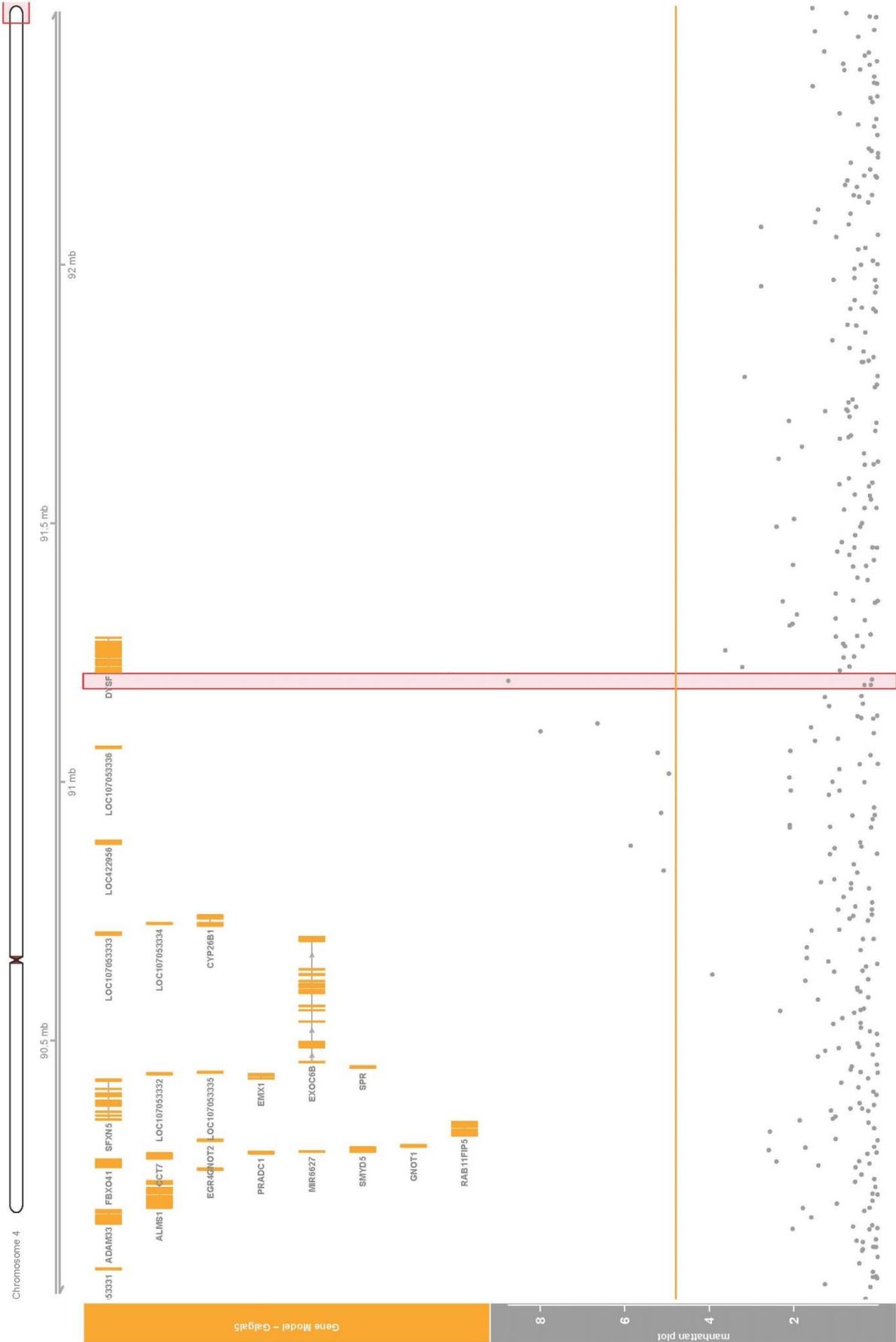


Additional file 5: Figure S5.





Additional file 7: Figure S7.



**Additional file 8: Table S1.**

Phenotype*	eQTL	GGA	SNP ID	Position** (pb)	P-value***	Corresponding QTL
<i>MYH15</i>	eQTL1	1	Gga_rs15350490	93828600	2.95 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH15</i>	eQTL1	1	GGaluGA033104	93885278	2.95 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>DYSF</i>	eQTL2	2	Gga_rs14138708	11017062	9.66 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>PNPLA7</i>	eQTL3	2	Gga_rs14139566	12547472	1.29 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>DYSF</i>	eQTL3	2	Gga_rs14139566	12547472	5.21 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>SGCB</i>	eQTL4	2	Gga_rs14142253	14889365	<b>5.52 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>SGCB</i>	eQTL5	4	Gga_rs15633060	82783597	2.02 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>SGCB</i>	eQTL5	4	Gga_rs14498069	82805850	1.33 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>FNI</i>	eQTL6	4	GGaluGA271193	90877143	1.13 x 10 <sup>-5</sup>	QTL4
<i>FNI</i>	eQTL6	4	GGaluGA271252	91016447	1.38 x 10 <sup>-5</sup>	QTL4
<i>FNI</i>	eQTL6	4	Gga_rs13776465	91056759	6.82 x 10 <sup>-6</sup>	QTL4
<i>FNI</i>	eQTL6	4	Gga_rs16454745	91098157	<b>1.27 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL4
<i>MYH13</i>	eQTL6	4	Gga_rs16454745	91098157	1.21 x 10 <sup>-5</sup>	QTL4
<i>FNI</i>	eQTL6	4	Gga_rs14506759	91113465	<b>4.33 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL4
<i>COL6A3</i>	eQTL6	4	Gga_rs14506759	91113465	1.29 x 10 <sup>-5</sup>	QTL4
<i>FNI</i>	eQTL6	4	Gga_rs15648179	91195923	<b>1.21 x 10<sup>-6</sup></b>	QTL4
<i>COL6A3</i>	eQTL6	4	Gga_rs15648179	91195923	1.62 x 10 <sup>-5</sup>	QTL4
<i>MYH13</i>	eQTL6	4	Gga_rs15648179	91195923	1.04 x 10 <sup>-5</sup>	QTL4
<i>CAPN3</i>	eQTL6	4	Gga_rs15648179	91195923	2.85 x 10 <sup>-6</sup>	QTL4
<i>SGCB</i>	eQTL7	5	Gga_rs14514700	10813149	1.45 x 10 <sup>-5</sup>	QTL5
<i>MYH15</i>	eQTL8	6	Gga_rs14569880	7846186	<b>3.59 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	GGaluGA300550	18876300	2.24 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	GGaluGA300856	19644770	2.16 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs16004588	19885672	<b>1.99 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	GGaluGA300927	19916374	2.53 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs14747990	19919971	1.20 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs16551619	20173119	4.72 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs14581509	20191350	<b>1.12 x 10<sup>-6</sup></b>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	GGaluGA301022	20209447	3.47 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs16551732	20300076	7.30 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs14581613	20340618	5.41 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>DYSF</i>	eQTL9	6	Gga_rs14581613	20340618	2.26 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>PDGFR<math>\alpha</math></i>	eQTL9	6	Gga_rs14581613	20340618	2.58 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	GGaluGA301058	20348510	<b>6.38 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs14581782	20466842	1.24 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs15795080	20497904	1.24 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs16552220	20899730	7.18 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs14582418	21428502	<b>3.45 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs16552487	21451023	<b>1.78 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs14582456	21523608	<b>2.90 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	GGaluGA301386	21789185	5.41 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL9	6	Gga_rs15796546	22181753	3.21 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL10	8	GGaluGA327044	14981718	1.24 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL10	8	GGaluGA327060	15017199	1.46 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>FNI</i>	eQTL11	9	Gga_rs14670735	3247110	2.86 x 10 <sup>-5</sup>	

<i>MYHCD</i>	eQTL12	11	Gga_rs15624232	17522949	1.72 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	GGaluGA089543	18654409	2.41 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14986262	18689560	1.67 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14048799	18767047	6.13 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	GGaluGA089616	18780013	6.13 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14048831	18798000	6.13 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14048897	18828242	6.13 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14048907	18840435	6.13 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs15673122	18850967	6.13 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs15673151	18869930	4.42 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14048959	18883392	4.42 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	GGaluGA089676	18904308	4.42 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14048983	18910817	4.42 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs13716246	18942750	4.42 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs15673825	19090345	9.50 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs13716306	19099718	9.50 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14049158	19109704	9.50 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs13716307	19119257	9.50 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14049196	19157040	1.09 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14049226	19188389	1.09 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs14049233	19202371	2.34 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	GGaluGA089825	19211057	2.34 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs15675016	19468890	1.19 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	GGaluGA090066	19512769	1.19 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs15675344	19678293	2.96 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	Gga_rs15675477	19824102	2.96 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	GGaluGA090146	19873243	2.96 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL13	12	GGaluGA090149	19885805	2.96 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>TUBB4B</i>	eQTL14	13	Gga_rs14055240	3931630	2.22 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>TUBB4B</i>	eQTL14	13	Gga_rs14055227	3946268	4.02 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>TUBB4B</i>	eQTL14	13	GGaluGA091901	3952155	4.02 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>TUBB4B</i>	eQTL14	13	Gga_rs14055198	3978869	2.22 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs15807988	1193728	1.08 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	GGaluGA112420	1341951	2.34 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs14104648	1384574	<b>1.65 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	GGaluGA112483	1437473	6.41 x 10 <sup>-6</sup>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	GGaluGA112512	1496390	1.31 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs15034779	1497553	1.31 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs14104352	1724666	<b>1.52 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs15806580	1740184	<b>5.32 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs13734851	1756449	<b>1.09 x 10<sup>-6</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	GGaluGA112716	1901705	<b>9.65 x 10<sup>-10</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	GGaluGA112724	1916155	<b>9.91 x 10<sup>-10</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs15034195	1932600	<b>9.55 x 10<sup>-10</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs15034122	1967526	<b>1.25 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs14104015	1985536	2.36 x 10 <sup>-6</sup>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs15034085	2008784	<b>9.47 x 10<sup>-8</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs15034052	2036405	<b>2.00 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL12
<i>LRSAM1</i>	eQTL15	17	Gga_rs14103950	2071102	2.17 x 10 <sup>-6</sup>	QTL12



<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	GGaluGA112834	2105706	2.68 x 10 <sup>-6</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	Gga_rs10728503	2196528	4.98 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	Gga_rs14103847	2241378	2.58 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	Gga_rs14103837	2245302	1.42 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	GGaluGA112954	2283348	<b>2.15 x 10<sup>-7</sup></b>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	GGaluGA112991	2317679	2.88 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	Gga_rs15804842	2376482	1.33 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	GGaluGA113079	2433579	1.99 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	GGaluGA113081	2442434	1.30 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	Gga_rs16753087	2656173	8.78 x 10 <sup>-6</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	GGaluGA113309	2766427	4.14 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>LRSAMI</i>	eQTL15	17	GGaluGA113338	2833719	5.41 x 10 <sup>-5</sup>	QTL12
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs15809155	297096	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs14105451	306139	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs14105472	343079	4.40 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	GGaluGA117789	343205	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs15809447	469140	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs15809547	517541	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs14105637	523233	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs15035593	544688	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs14105707	583202	<b>7.08 x 10<sup>-7</sup></b>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs14105726	601151	4.40 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs14105739	610899	<b>1.17 x 10<sup>-6</sup></b>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs15809816	619881	4.53 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs15810060	699832	5.03 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>MYH1F</i>	eQTL16	18	Gga_rs13506093	828426	7.91 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL17	18	Gga_rs15826142	6504359	2.12 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>CAV3</i>	eQTL17	18	Gga_rs14112328	6532115	6.24 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>LRSAMI</i>	eQTL18	22	GGaluGA186934	2899623	1.67 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>PNPLA7</i>	eQTL18	22	GGaluGA186934	2899623	2.78 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>TUBB4B</i>	eQTL18	22	GGaluGA186934	2899623	1.12 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>LRSAMI</i>	eQTL18	22	GGaluGA186952	2939179	2.36 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>PNPLA7</i>	eQTL18	22	GGaluGA186952	2939179	1.06 x 10 <sup>-4</sup>	
<i>TUBB4B</i>	eQTL18	22	GGaluGA186952	2939179	1.48 x 10 <sup>-6</sup>	
<i>TUBB4B</i>	eQTL18	22	GGaluGA186964	2968318	1.94 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1E</i>	eQTL19	23	Gga_rs14289870	3040351	1.24 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYHCD</i>	eQTL20	24	Gga_rs14293376	1575682	1.51 x 10 <sup>-5</sup>	
<i>MYH1B</i>	eQTL21	27	Gga_rs16207951	3938987	8.56 x 10 <sup>-5</sup>	

Co-localization with QTL associated with WS and meat quality traits is indicated in the last column.

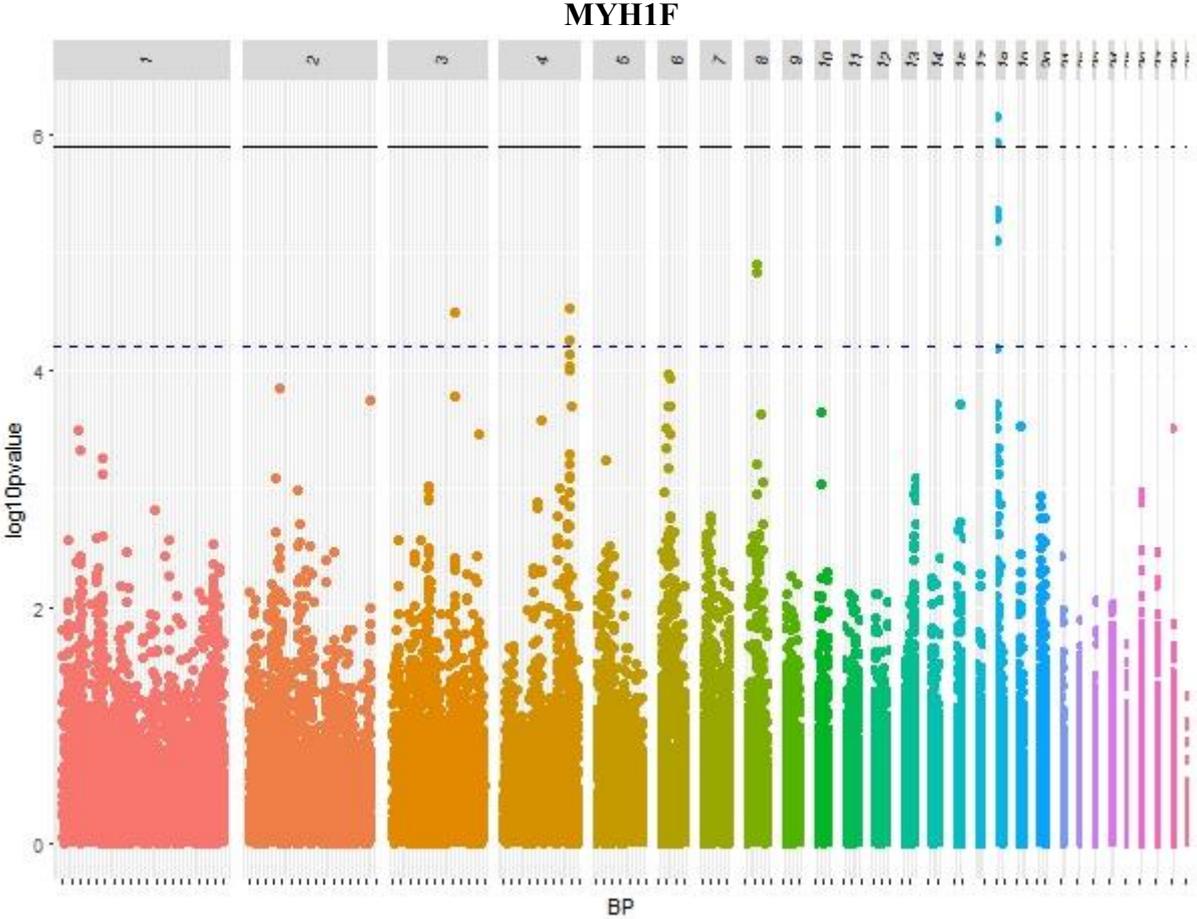
\* *MYH15* myosin heavy chain 15, *DYSF* dysferlin, *PNPLA7* patatin-like phospholipase domain containing 7, *SGCB* sarcoglycan beta, *FNI* fibronectin 1, *MYH13* myosin heavy chain 13, *COL6A3* collagen type 6 alpha 3, *CAPN3* calpain 3, *MYH1B* embryonic myosin heavy chain 3, *PDGFRα* platelet derived growth factor receptor alpha, *MYH1F* neonatal myosin

heavy chain, *MYHCD* myosin heavy chain CD, *CAV3* caveolin 3, *TUBB4B* tubulin beta 4B  
class IVb, *LRSAMI* leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1, *MYH1E* adult  
myosin heavy chain

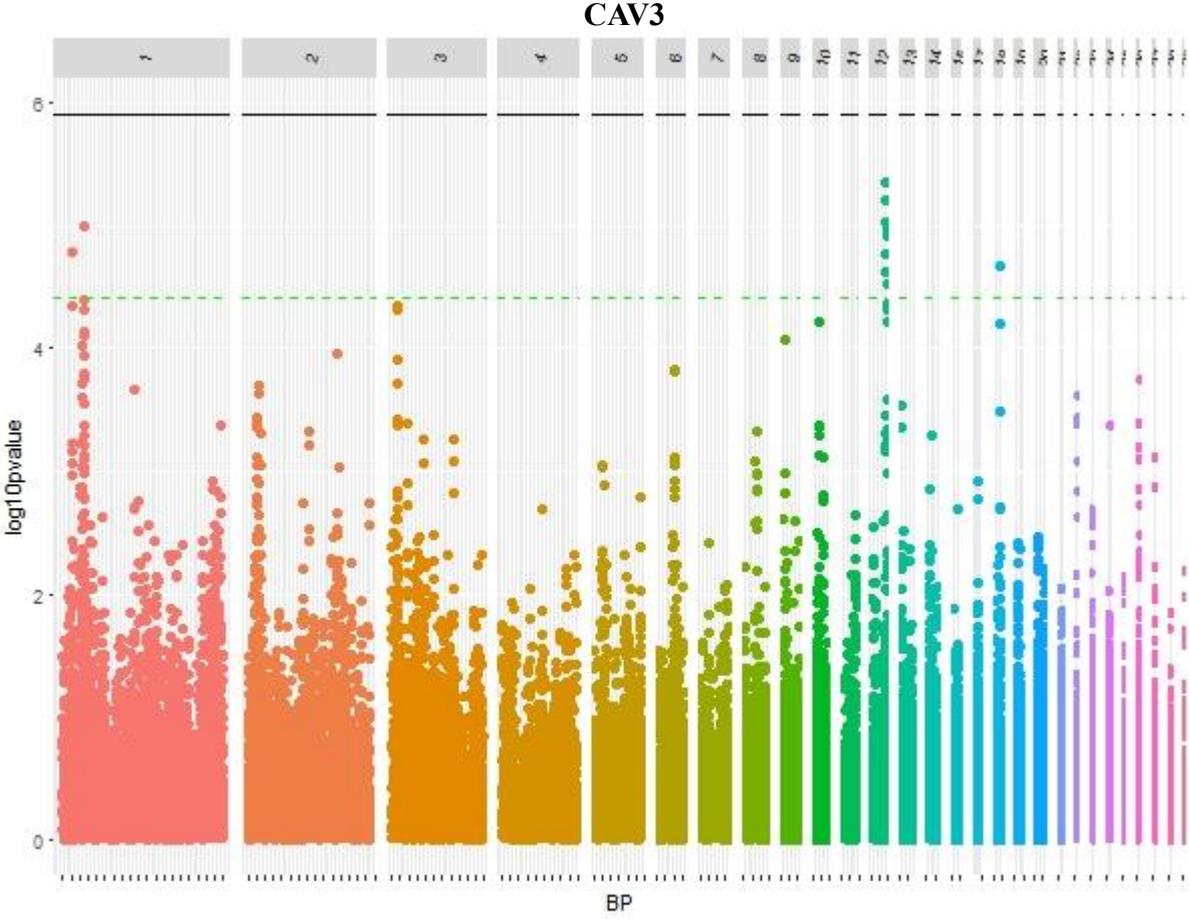
\*\* Positions are indicated on galgal5 assembly

\*\*\* Genome-wide significant *P*-values are indicated in bold

Additional file 9: Figure S8.



Additional file 10: Figure S9.



**Additional file 11: Table S2.**

<b>Gene</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>MYH15</i>	395534	TTCAAGCAAACCCAGCCCTA	GATTTTTTCAGCAACCGGGTG
<i>PDGFR<math>\alpha</math></i>	395509	GAGTCACAAAAGCCGTGGACAT	TGTTTTCTCACAGGACCGCTC
<i>SGCB</i>	422760	TGTAGAGCGCAGGAACGTCAAT	AATCACCGCCCAGATAACGAG
<i>COL6A3</i>	396548	AGCCCAAAGTGACCTACACG	GCAGATGTCCATGACATTTTCAG
<i>FN1</i>	396133	CACAAACACCAACGTCAACT	GTTTGGATGGTAATCGTGGCAG
<i>LRSAM1</i>	417265	AGGTCCTCAATGTGAAAGGCA	TTGCAGAGGAACTGCTGAATG
<i>PNPLA7</i>	427774	TTTCACCATCAAGGCCAATCG	GTCCAGCCTCAACTTCCATCCA
<i>TUBB4B</i>	417255	CAGACCGGATTATGAACACCTT	CACCGTATGTTGGCGTAGTT
<i>MYH13</i>	768487	GGAATGACAACCTCCTCACGCT	GCTAGCTGGAAAGTCACTCTGG
<i>MYH1B</i>	374069	AGGAGCTGTCCAATGTCAACCTC	GCAGAAGAAAGCAACAGAGGGTTC
<i>MYH1E</i>	427788	CCAAATTCGCAAGATCCAAC	CTTATGCCACTTTGTTGTCACGAC
<i>MYH1F</i>	768566	AGCTGTCCAATGTCAACCTTTCC	TGCCTCAGGTCACACTTTAGC
<i>MYOCD</i>	427790	GTCTGAGCACTCCTTGCTGATT	CGTTGTTCATGGAATGCGG
<i>DYSF</i>	425353	GGTCGGGATGAGCCAAACAT	GTTTCGGGAAGGCGTAGATGA
<i>CAPN3</i>	423233	CAAACCAGTGCTCATTCCT	GCCTGACCCACACTGATTTT
<i>CAV3</i>	378796	GAAAGGCAGCTACACCACCT	GTAGATGCGGCTGACACACT
<i>PDE3B</i>	423064	CACCATCTCAGCGAAAATCACA	TCTCCTAGCTGCCGCTCATCTT

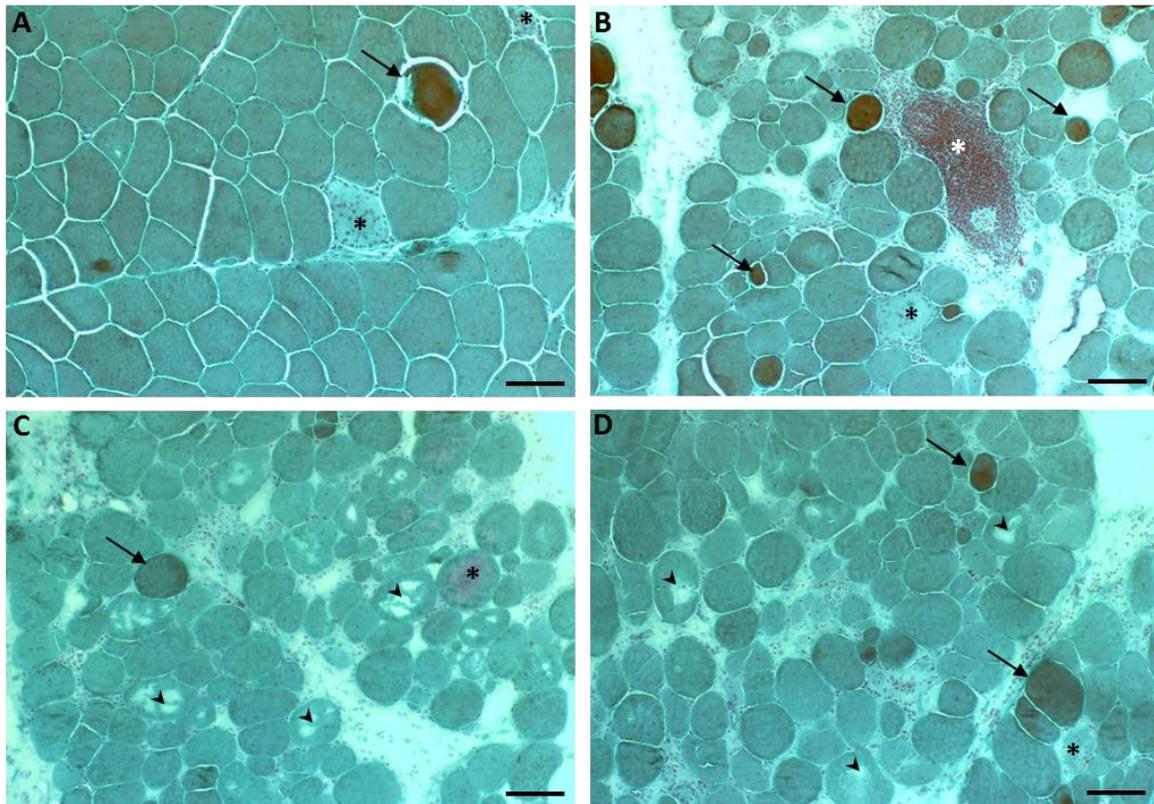
## Chapitre 2 : Nouveaux indicateurs et marqueurs moléculaires des défauts WS et WB

Afin de comprendre la mise en place des dysfonctionnements cellulaires qui conduisent aux défauts WS et WB et d'identifier des biomarqueurs de ces myopathies, des analyses histopathologiques, protéomiques et transcriptomiques ont été réalisées à partir d'échantillons de muscles P. major issus de la lignée à forte croissance et à fort développement musculaire décrite précédemment (Cf. Deuxième partie, II.2). Les analyses histologiques et protéomiques ont été réalisées en amont de l'analyse transcriptomique, ce qui a permis de raffiner le choix des échantillons considérés dans cette étape.

### I. Caractérisation histologique des défauts WS et WB

Des sections transversales de muscle P. major de dix micromètres ont été réalisées pour l'ensemble des 4 groupes (8 échantillons par groupe) : **T** indemne de défaut (WS=0 et WB=0), **WS** uniquement atteint de WS sévère (WS=2 et WB=0), **WB** uniquement atteint de WB modéré ou sévère (WS=0 et WB= 1 ou 2) et **WSWB** atteint de WS et WB sévères (WS=2 et WB=2). Une coloration au Trichrome de Gomori a été utilisée pour évaluer les modifications structurales au sein des différents muscles (**Figure 18**) et a également permis de valider la qualité des tissus après décongélation et coupe.

Les observations histologiques des muscles atteints de WS et/ou de WB sont en accord avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature (Kuttappan *et al.*, 2013c ; Sihvo *et al.*, 2013 ; Ferreira *et al.*, 2014 ; Mazzoni *et al.*, 2015 ; Petracci *et al.*, 2015). Elles montrent des fibres en nécrose et de tailles variables, parfois hypercontractées, ainsi que des signes de régénération (splitting et régénération segmentaire) et d'inflammation (infiltration de cellules inflammatoires, foyer inflammatoire comme sur la **Figure 18 B**). Les tissus conjonctifs endomysial et périnysial sont très étendus dans les muscles sévèrement atteints par les deux défauts à la fois ou uniquement par le défaut WB (**Figure 18 C et D**). Ils sont légèrement plus développés que la normale dans les muscles WS et parfois dans les muscles macroscopiquement indemnes de défaut. Il y a également beaucoup de tissu adipeux dans le périnysium des muscles WSWB et les muscles WS (**Figure 18 B**), peu dans le périnysium des muscles WB et peu voire pas du tout dans les muscles T.



**Figure 18** : Coloration Trichrome de Gomori de muscles P. major visuellement indemnes de défaut (A) et atteints de WS sévère (B), WB sévère (C) ou des deux défauts à la fois (D). Les flèches indiquent des fibres hypercontractées, les astérisques noirs des fibres en nécrose, l'astérisque blanc un foyer inflammatoire et les têtes de flèches des vacuoles présentes au sein des fibres. Échelle : 100  $\mu$ m

De manière intéressante, on observe une présence importante de vacuoles au sein des fibres des muscles WB et WSWB (**Figure 18 C et D**) ainsi que des fibres « fantôme », phénomènes qui restent plutôt rares voire absents dans les autres groupes de muscles. Ces phénomènes n'ont jamais été décrits dans les muscles présentant les défauts WS et/ou WB. Ces vacuoles pourraient être le signe de processus d'autophagie pathologiques qui conduiraient, à terme, à vider entièrement le contenu de la cellule et donc à l'apparition de fibres « fantôme ». De plus, comme l'ont également montré certaines études (Kuttappan *et al.*, 2013c ; Russo *et al.*, 2015 ; Trocino *et al.*, 2015 ; Sihvo *et al.*, 2016 ; Papah *et al.*, 2017), les muscles macroscopiquement indemnes de défaut présentent, dans notre étude, des lésions de type nécrose, une extension des tissus endomysium et pérимysium, quelques infiltrations de tissu adipeux et de cellules inflammatoires, quelques fibres hypercontractées et des phénomènes de régénération. Ceci indique qu'une partie des muscles macroscopiquement indemnes de défauts ne peuvent pas être considérés comme des muscles normaux, et souligne l'intérêt d'une caractérisation histologique fine des défauts en complément de la notation macroscopique des filets.

## II. Analyse du profil protéomique en lien avec l'apparition des défauts WS et WB

Le profil protéomique des 39 muscles P. major issus des 4 groupes du second dispositif (i.e., groupes T, WS, WB et WSWB) a été analysé en considérant la fraction soluble des protéines musculaires (i.e., protéines sarcoplasmiques), c'est-à-dire principalement les enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique. L'extraction et le dosage des protéines sarcoplasmiques à partir des échantillons de muscles broyés, ainsi que les gels 2D, l'analyse d'images des gels pour détecter les spots différentiels (un spot = une protéine) et l'annotation des spots (MALDI TOV, spectrométrie de masse) ont été réalisés par l'équipe QUAPA de l'INRA de Theix. Ces travaux étaient menés dans le cadre du projet TECNOVIA (2015-2018), financé par les régions Bretagne et Pays de la Loire dont l'objectif était de caractériser les défauts technologiques des viandes blanches (porc et poulet) et de rechercher des voies d'amélioration par la génétique et l'alimentation. Ils faisaient partie intégrante d'un des premiers volets qui consistait à acquérir des connaissances sur les bases moléculaires et physiologiques impliquées dans l'apparition des défauts d'intégrité musculaires chez le poulet.

Un total de 81 protéines a été annoté. Une analyse de variance a été réalisée pour comparer les groupes T, WS, WB et WSWB pour chaque protéine identifiée. Les protéines différentiellement exprimées (DE) entre les groupes ont été déterminées par comparaison deux à deux. Les protéines ont été considérées DE si la p-value était  $\leq 0,05$ . Seulement 6 protéines différentielles ont été identifiées entre les muscles normaux (T) et les muscles atteints de WS sévère (WS). On observe plus de protéines différentielles quand on compare les muscles atteints de WB modéré ou sévère (WB) et des muscles normaux (i.e., 14), même si le nombre de protéines concernées reste relativement peu élevé. Ce nombre augmente significativement lorsque l'on compare les muscles sains et ceux atteints des deux défauts (WSWB). Ainsi, 39 protéines différentielles ont été identifiées entre ces deux types de muscles (**Tableau 10**), avec 19 et 20 protéines qui étaient respectivement surabondantes et sous-abondantes dans les muscles WSWB. Les protéines surabondantes dans ces muscles étaient majoritairement impliquées dans des processus métaboliques liés à la réponse au stimulus (réponse aux espèces réactives de l'oxygène ROS, réponse inflammatoire et réponse au stress oxydatif) alors que celles sous-abondantes étaient principalement impliquées dans des processus glycolytiques et la gluconéogenèse. Ces résultats, en accord avec l'analyse protéomique de Kuttappan *et al.* (2017), pourraient indiquer une diminution de l'activité glycolytique dans les muscles sévèrement atteints par les deux défauts, ainsi que la présence d'un stress oxydatif important.



Le faible nombre de protéines DE entre les muscles normaux et les muscles atteints de WS, pourrait en partie être dû au fait que l'analyse protéomique n'a porté que sur la fraction soluble et donc les protéines sarcoplasmiques du muscle. Or les gènes candidats identifiés lors de l'analyse génétique du défaut WS (Cf. Chapitre 1) suggèrent un impact plus important du développement de ce type de défaut sur la structure du muscle, et donc les protéines myofibrillaires et de la matrice extracellulaire (MEC), que sur le métabolisme musculaire. Il aurait certainement fallu exploiter également la fraction des protéines myofibrillaires et insolubles de la MEC, pour pouvoir comparer les profils protéiques complets des quatre groupes de muscles.

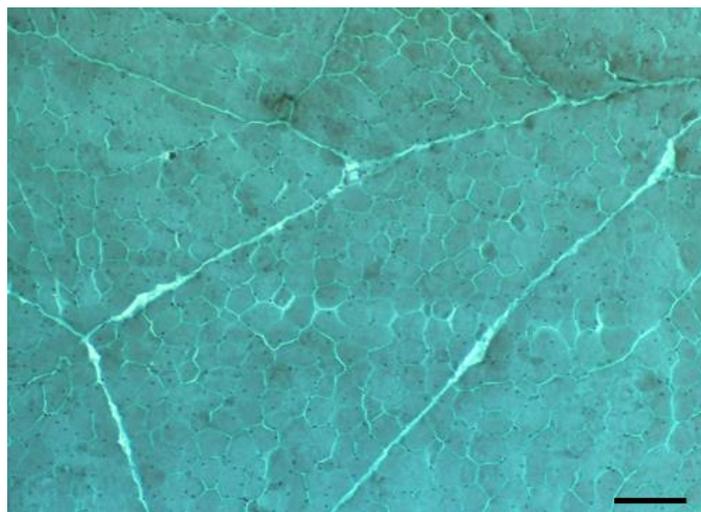
**Tableau 10** : Protéines différentielles entre les muscles visuellement indemnes de défauts et les muscles sévèrement atteints par du WS et du WB

UniProt ID	Protéine	Gène (GeneID)	Sur régulation	p-value	Fonction
<b>Q5ZLN1</b>	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1 (428969)	T	0,0002	Métabolisme des glucides (glycolyse, gluconéogenèse)
<b>E1BXC2</b>	S-formylglutathione hydrolase	ESD (418856)	T	0,0006	Processus catabolique du formaldéhyde
<b>G1K303</b>	Hydroxyacylglutathione hydrolase	HAGH (416537)	T	0,0006	Processus catabolique du méthylglyoxal en D-lactate par le S-lactoyl-glutathion
<b>Q5ZHN1</b>	Charged multivesicular body protein 2a	CHMP2A (776036)	T	0,0019	
<b>Q5ZHV4</b>	Phosphoglycerate mutase	BPGM (418172)	T	0,002	Métabolisme des glucides (glycolyse, gluconéogenèse)
<b>E1BT93</b>	Uncharacterized protein		T	0,0026	
<b>P02604</b>	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	MYL1 (396470)	T	0,0027	Contraction muscle strié
<b>P07322</b>	Bete-enolase	ENO3 (396016)	T	0,0028	Métabolisme des glucides (glycolyse, gluconéogenèse)
<b>P00548</b>	Pyruvate kinase	PKM (396456)	T	0,003	Métabolisme des glucides (glycolyse, gluconéogenèse)
<b>A0A1D5PA73</b>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	ASIC1 (426883)	T	0,0031	Processus métabolique des glucides; processus catabolique du glycérol-3-phosphate
<b>F1NN63</b>	Uncharacterized protein	PGM1 (424691)	T	0,0047	Processus métabolique du glucose, processus de biosynthèse du glycogène
<b>P84172</b>	Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM (430889)	T	0,0056	Elongation
<b>Q5ZKV4</b>	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2	NUBP2 (416402)	T	0,0096	
<b>E1C155</b>	Aldehyde dehydrogenase 6 family member A1	ALDH6A1 (423345)	T	0,0101	Catabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée
<b>P00940</b>	Triosephosphate isomerase	TPI1 (396435)	T	0,0156	Métabolisme des glucides (glycolyse, gluconéogenèse)
<b>A0A1D5PPU3</b>	Uncharacterized protein	LACTB2 (420178)	T	0,0168	
<b>F1NAX3</b>	Glycerol-3-phosphate phosphatase	PGP (416559)	T	0,017	Processus de biosynthèse du glycérol; processus métabolique des glycérophospholipides;

					régulation négative de la gluconéogenèse
<b>P00565</b>	Creatine kinase M-type	CKM (396507)	T	0,0172	Réponse au stress
<b>Q7SX63</b>	Heat shock protein 70	HSP70 (423504)	T	0,0257	Réponse cellulaire au stress
<b>P08250</b>	Apolipoprotein A-I	APOA1 (396536)	WSWB	0,0001	Processus métabolique du cholestérol; Processus métabolique des triglycérides
<b>F1P593</b>	Heat shock protein beta-1	HSPB1 (396227)	WSWB	0,0002	Réponse au stress; transduction de signal intracellulaire (voies de signalisation VEGF, NF-kappaB et MAPK)
<b>A0A1D5NW68</b>	Serum albumin	ALB (396197)	WSWB	0,0004	Transport
<b>A0A1D5PPL5</b>	Prefoldin subunit 3	VBP1 (422355)	WSWB	0,0006	Repliement des protéines
<b>P41263</b>	Retinol-binding protein 4	RBP4 (396166)	WSWB	0,0022	Gluconéogenèse, homéostasie du glucose, processus métabolique du rétinol
<b>D5M8S2</b>	DJ-1	DJ-1 (395277)	WSWB	0,0028	Réponse cellulaire au peroxyde d'hydrogène; détoxification de l'ion mercure; processus métabolique du peroxyde d'hydrogène
<b>A0A1D5P0D2</b>	Uncharacterized protein		WSWB	0,003	
<b>A0A1I7Q422</b>	Transthyretin	TTR (396277)	WSWB	0,0032	Processus métabolique du rétinol; transport des hormones thyroïdiennes
<b>R4GM10</b>	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOC (395492)	WSWB	0,0044	Glycolyse; processus métabolique fructose 1-6 biphosphate aldolase; gluconéogenèse
<b>F1P1L8</b>	Uncharacterized protein	SERPINB6 (420895)	WSWB	0,0054	
<b>A0A1D5NYF3</b>	Uncharacterized protein	FABP4 (374165)	WSWB	0,006	Régulation de la réponse inflammatoire, catabolisme des triglycérides
<b>Q8JG64</b>	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3 (373899)	WSWB	0,0091	Homéostasie redox cellulaire, régulation positive de la voie de signalisation apoptotique extrinsèque, repliement des protéines, réponse au stress du réticulum endoplasmique
<b>P31395</b>	Stathmin	STMN1 (396057)	WSWB	0,0099	Régulation de l'organisation du cytosquelette; régulation de la polymérisation ou de la dépolymérisation des microtubules
<b>A0A1D5PDK4</b>	Adenosine deaminase		WSWB	0,01	
<b>Q90593</b>	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5 (396487)	WSWB	0,0173	Réponse cellulaire à la privation de glucose; réponse cellulaire à l'interleukine-4; régulation négative du processus apoptotique; protéolyse impliquée dans le processus catabolique des protéines cellulaires
<b>A0A1D5P8K2</b>	Uncharacterized protein	HSPB2 (414136)	WSWB	0,0187	
<b>F1NVF3</b>	Uncharacterized protein		WSWB	0,0224	
<b>E1BZ05</b>	Desmin	DES (395906)	WSWB	0,0247	Organisation du filament intermédiaire
<b>P02789</b>	Ovotransferrin	TF (396241)	WSWB	0,0377	Réponse en phase aiguë; séquestration extracellulaire d'ion fer

### III. Choix du dispositif expérimental pour l'analyse transcriptomique

L'analyse des profils en protéines sarcoplasmiques des muscles a révélé que les groupes T et WSWB présentaient des différences substantielles par comparaison aux autres groupes atteints seulement par un seul des défauts (WS ou WB). Ceci nous a conduit à ne conserver que ces deux groupes de muscles lors de l'analyse transcriptomique. Par ailleurs, l'analyse histologique de ces muscles a montré qu'une proportion significative des muscles macroscopiquement indemnes de défauts (issus du groupe T) présentait plusieurs types de lésions musculaires. Pour cette raison, il nous a semblé important de considérer dans l'analyse un « vrai » contrôle négatif, c'est-à-dire un groupe de muscles à la fois macroscopiquement et histologiquement indemnes des lésions associées aux défauts WS ou WB afin de mieux caractériser les processus biologiques impliqués dans la mise en place de ces physiopathologies. Nous avons donc inclus dans le dispositif expérimental dédié à l'analyse transcriptomique des animaux issus d'une souche à croissance lente maintenue à l'INRA (la lignée de chair X33). Ses performances de croissance sont proches de celles des animaux utilisés en production Label Rouge ou Biologique qui sont abattus à un âge deux fois plus élevé que le poulet standard. A 42 jours, le poids vif de ces animaux était trois fois moins élevé que celui des animaux issus de la souche commerciale (1,0 vs 3,3 kg) et le rendement en muscle P. major était 25% moins élevé (13,5 vs 17,9 %). D'un point de vue histologique, les muscles P. major de ces animaux ne présentaient aucune lésion musculaire (**Figure 19**).



**Figure 19** : Coloration Trichrome de Gomori de muscle P. major issu de la souche à croissance plus lente X33.  
Échelle : 100 µm

Inclure une lignée à croissance lente dans laquelle aucun défaut n'a été observé permettait également de pouvoir dissocier les changements biologiques induits par la sélection sur le long terme sur la croissance et le développement musculaire des dérégulations biologiques associées à l'établissement des défauts WS et WB.

## **IV. Les analyses de l'expression différentielle et de réseaux de co-expression de gènes révèlent des mécanismes moléculaires et des biomarqueurs candidats impliqués dans les myopathies du filet chez le poulet - Article 2**

Afin de progresser dans la compréhension des modifications structurales et des acteurs moléculaires impliqués dans les pathologies musculaires WS et WB et d'identifier des biomarqueurs pouvant servir d'outils de diagnostic des myopathies, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur puce poulet Agilent 8 × 60K. Cette étude a été associée à une caractérisation histologique fine des 24 muscles P. major inclus dans le dispositif, à savoir : 8 muscles issus de poulets à croissance lente X33 et 16 issus de poulets commerciaux à croissance rapide dont les filets sont visuellement indemnes de défauts (T, n=8) ou sévèrement atteints par les deux types de défauts (WSWB, n=8).

L'analyse histologique de ces muscles a montré une modification de l'architecture musculaire induite par la sélection sur la croissance et le développement musculaire, impliquant la mise en place de phénomènes de fibrose et d'adipose, même chez les muscles visuellement indemnes de défauts mais qui étaient exacerbés dans les muscles sévèrement atteints, ainsi que la diminution de la vascularisation et une plus forte variation de la taille des fibres. Elle a également permis d'identifier des phénotypes histologiques fins utiles pour quantifier avec précision le degré des lésions musculaires et d'améliorer de manière significative le diagnostic qui est actuellement basé sur la notation visuelle ou la palpation du muscle après l'abattage.

L'analyse différentielle a mis en évidence un total de 10 482 gènes DE entre les trois groupes (p-value ajustée <0,05) avec un fold-change  $\geq 1,2$ . L'analyse fonctionnelle par annotation « Gene Ontology » a montré que la sélection en faveur de la croissance rapide et du rendement en filet a progressivement conduit à la mise en place d'un environnement métabolique et structurel du muscle favorable au développement des myopathies. En particulier, cet environnement a pu conduire à des modifications des voies métaboliques, passant d'un métabolisme glycolytique vers des voies cataboliques alternatives pour produire de l'énergie, qui ont entraîné une réponse adaptative au stress oxydatif ainsi que des premiers signes de processus inflammatoires, de régénération et de fibrose. Tous ces processus sont intensifiés dans les muscles atteints de myopathies sévères, dans lesquels de nouveaux mécanismes liés aux défenses cellulaires et au remodelage sont également activés.

L'étude des corrélations entre les niveaux d'expression des gènes et les phénotypes histologiques quantitatifs à l'aide de la construction de réseaux de gènes (WGCNA) a constitué une approche complémentaire de l'analyse différentielle. Ce portrait moléculaire et histologique permet d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes sous-jacents aux défauts WS et WB et apporte des résultats originaux avec l'identification de biomarqueurs dont l'expression est fortement corrélée avec les principales lésions histologiques associées aux défauts. En effet, l'analyse intégrée de ces données (génétiqes, moléculaires et histologiques) a permis l'identification d'un set de biomarqueurs des myopathies dont l'intérêt devra être validé dans une plus grande population et sur d'autres fonds génétiques.

**Differential expression and co-expression gene network analyses reveal molecular mechanisms and candidate biomarkers involved in breast muscle myopathies in chicken**

Eva Pampouille<sup>1,2</sup>, Christelle Hennequet-Antier<sup>1</sup>, Christophe Praud<sup>1</sup>, Amélie Juanchich<sup>1</sup>, Aurélien Brionne<sup>1</sup>, Estelle Godet<sup>1</sup>, Thierry Bordeau<sup>1</sup>, Frédéric Fagnou<sup>2</sup>, Elisabeth Le Bihan-Duval<sup>1</sup>, Cécile Berri<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup>Hubbard SAS, Mauguérand, 22800 Le Foeil - Quintin, France

\*Corresponding author: [cecile.berri@inra.fr](mailto:cecile.berri@inra.fr)

The broiler industry is facing an increasing prevalence of breast myopathies, such as white striping (WS) and wooden breast (WB), and the precise aetiology of these occurrences remains poorly understood. To progress our understanding of the structural changes and molecular pathways involved in these myopathies, a transcriptomic analysis was performed using an 8×60K Agilent chicken microarray and histological study. The study used *pectoralis major* muscles from three groups: slow-growing animals (n=8), fast-growing animals visually free from defects (n=8), or severely affected by both WS and WB (n=8). In addition, a weighted correlation network analysis was performed to investigate the relationship between modules of co-expressed genes and histological traits. Functional analysis showed that selection for fast growing and breast meat yield has progressively led to conditions favouring metabolic shifts towards alternative catabolic pathways to produce energy, leading to an adaptive response to oxidative stress and the first signs of inflammatory, regeneration and fibrosis processes. All these processes are intensified in muscles affected by severe myopathies, in which new mechanisms related to cellular defences and remodelling are also activated. However, our study opens new perspectives for myopathy diagnosis by highlighting fine histological phenotypes and genes whose expression was strongly correlated with defects.

## **Introduction**

The poultry industry relies on the production of fast-growing chickens, which are slaughtered at high weights and intended for cutting and processing. It is currently facing severe myopathic defects, such as white striping (WS), which is characterized by the appearance of lipid and connective inclusions that develop parallel to the muscle fibres<sup>1-3</sup>, or wooden breast (WB), which is characterized by a heterogeneity of colour, excessive surface exudate and a loss of muscle elasticity<sup>4,5</sup>. These two defects significantly impair breast fillet appearance and therefore consumer purchases<sup>6</sup>. Compared to normal fillets, these defects also affect meat



nutritional value by increasing fat and connective tissue content and lowering muscle protein content<sup>7-11</sup> and water holding capacity (WHC), resulting in higher drip (DL) and cooking (CL) loss, lower curing cooking yield (CCY) and marinade uptake<sup>3,5,11,12</sup>. Breast fillets that are severely affected by WS or WB are difficult to market fresh and are more often valued as raw materials for processing or downgraded for pet food in the most severe cases<sup>13</sup>. Therefore, these defects lead to significant economic losses for the poultry industry. Moreover, an increasing incidence of muscular defects is likely to degrade the image of chicken meat by consumers, as attested by the increasing number of articles dedicated to the subject in the specialized or general press.

Although myodegenerative defects are now widely described in the literature<sup>1-4,14</sup>, their precise aetiology remains unclear. What is certain is that the frequency and severity of these defects increase with the growth rate of the animals, their slaughter weight and their breast meat yield (BMY)<sup>3,7,15</sup>. In addition, their increasing occurrence corresponds to changes in current production practices, particularly the use of increasingly efficient genotypes and the slaughter of heavy broilers, whose meat is intended for processing. The genetic basis of WS and WB has been recently demonstrated<sup>16,17</sup>, but the genes involved in the control of these defects are still unknown despite the recent identification of QTL, which controls WS<sup>18</sup>. In one study several chromosomal regions of interest in WS were suggested, and the results indicated a polygenic determinism for the trait and include a list of putative candidate genes that primarily affect muscle metabolism, fibre structure and human neuromuscular disorders<sup>18</sup>. Therefore, improving understanding of the molecular mechanisms that underlie muscle susceptibility to WS and WB remains an important objective from the perspective of more efficient selection and improved breeding conditions.

Recent transcriptomic studies have described changes in muscle gene expression related to the occurrence and severity of myodegenerative defects measured in fast-growing broilers<sup>19-23</sup>. In

the current study, we compared the gene expression profile of the *pectoralis major* muscle between birds obtained from a slow-growing chicken line (SG) and birds obtained from a modern fast-growing line; all birds were visually scored as either severely affected by both WS and WB defects (FG-WSWB) or free from defects (FG-C). We further included a slow-growing line in which no defect was observed with the aim of identifying the biological changes induced by long-term selection on body weight and muscle development that has resulted in the establishment of the myopathies. This study is also focused on the search for fine and histological traits that can be used to quantify muscular defects with the aim of correlating them with gene expression and identifying biomarkers of myopathic muscles.

## Results

### Animals and descriptive statistics of meat quality phenotypes

The transcriptomic analysis was performed on  $3 \times 8$  individuals obtained from the SG, FG-C and FG-WSWB groups. FG individuals were obtained from a grand-parental population of 176 42-day-old broilers visually scored for WS and WB. Individuals were chosen to be representative of either the control (i.e., without any apparent defects) or the severely affected (i.e., affected with both the WS and WB defects) categories. SG birds were obtained from a slow-growing INRA experimental line that was also slaughtered at 42 days of age. Only body weight (BW) and *pectoralis major* yield (PMY) were measured in this line. Student's t-test revealed that BW at 42 days of age was more than three times higher (3324 vs. 999 g; p-value  $\leq 0.0001$ ) and PMY was 25% higher (17.9 vs. 13.5%; p-value  $\leq 0.0001$ ) in fast-growing broilers than in slow-growing birds.

The average phenotype values of the FG-C and FG-WSWB groups are described in Additional file 1. FG-C and FG-WSWB chickens showed similar BW and abdominal fatness (AFP). BMY did not differ between FG-WSWB and FG-C chickens (p-value = 0.07), while

the difference between the groups was significant when considering only PMY (p-value  $\leq$  0.05). FG-WSWB breast muscles exhibited much greater DL and CL (p-value  $\leq$  0.001 and p-value  $\leq$  0.01, respectively) and tended to have lower CCY and higher lightness ( $L^*$ ) (p-value = 0.07) than were observed in FG-C chickens. They did not differ in other meat quality traits, including lipid peroxidation index (evaluated through TBA-RS) after storage and shear force (SF) value after cooking.

### **Fine and quantitative histological traits**

To quantify muscular defects, quantitative histological traits were measured in *pectoralis major* muscle cross sections obtained from the three groups (SG, FG-C and FG-WSWB) (Table 1). A quantification of fibrosis and adiposis was performed using a collagen VI-bodipy co-labelling technique (Figure 1A-C). The percentage of the area labelled with collagen VI (representative of fibrosis) on the microscopic field was 4.2 and 6.9 times higher in FG-C and FG-WSWB muscles, respectively, than in SG *pectoralis major* muscles (p-values  $\leq$  0.0001). Thus, compared to SG muscles, both FG-C and FG-WSWB muscles showed extended endomysial and perimysial connective tissues, but the rate was 1.6 lower in the FG muscles macroscopically unaffected by WS and WB than in affected muscles. It is interesting to note that the percentage of the area labelled with collagen VI in one sample of the FG-WSWB group and one sample of the FG-C group was very different than the average value obtained in their respective groups, i.e., it was lower for the FG-WSWB sample (8.1%) and higher for the FG-C sample (13.6%). This suggests that these samples were either misclassified macroscopically or phenotypically intermediate between the FG-C and the FG-WSWB classes. However, the percentage of the area occupied by bodipy 493 staining (representative of adiposis) was approximately three times larger in FG-WSWB than in FG-C *pectoralis major* muscles (p-value  $\leq$  0.01) and was almost non-existent in SG *pectoralis major* muscles.

These results indicate that muscle histological architecture is modified according to the selection on growth rate and that fibrosis and adiposis establishment are exacerbated in cases of severe defects.

Capillary density and fibre size were measured using laminin-fibronectin co-immunolabelling (Figure 1D-F). The number of capillaries in the microscopic field was 1.5 and 2 times lower in severely affected muscles (FG-WSWB) than in macroscopically unaffected muscles (FG-C) ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ) and normal muscles (SG) ( $p\text{-value} \leq 0.0001$ ), respectively. In addition, the structure and location of the capillaries appeared to be modified in FG-WSWB muscles as we noticed the presence of lumens in their capillaries, likely because of vasodilatation, and of connective tissue extensions that altered the connection between capillaries and muscle fibres (Figure 1D-F).

As expected, the number of fibres in a microscopic field was significantly lower in FG than in SG muscles ( $p\text{-values} \leq 0.0001$ ) due to the difference in fibre size (measured as the minimal Feret's diameter), which was significantly lower in SG than in FG muscles ( $p\text{-values} \leq 0.0001$ ) (Table 1). The number of fibres per capillary was approximately 2 to 3 for FG muscles and approximately 6 for SG muscles. However, if we consider the fibre surface supplied by one capillary, it was almost two times larger in FG ( $20169 \mu\text{m}^2$  for FG-C and  $22150 \mu\text{m}^2$  for FG-WSWB) than in SG muscles ( $12961 \mu\text{m}^2$ ) ( $p\text{-values} \leq 0.05$ ) due to the difference in fibre size and conjunctive tissue extension. Interestingly, neither the number of fibres per capillary nor the averaged fibre size was different between FG-C and FG-WSWB muscles. However, there was significantly more fibre size variation in FG-WSWB muscles than in SG and FG-C muscles ( $p\text{-values} \leq 0.01$ ), probably due to the strong regeneration process that was observed in parallel with an increase in regenerative fibre foci frequency.

### **Differential gene expression analysis**

To gain a better understanding of the molecular pathways underlying *pectoralis major* muscle susceptibility to WS and WB defects, a custom chicken 8 × 60K Gene Expression Agilent Microarray was used to perform the transcriptomic analysis of muscles obtained from the SG, FG-C and FG-WSWB groups. Among the 61,657 probes spotted on the array, 43,688 (71%) were expressed, and 36,473 (59%) were annotated (corresponding to 12,272 genes) based on the NCBI EntrezGene database and Galgal5 chicken genome assembly. Based on quantitative histological characterization and a multidimensional scaling plot of gene expression, three samples (i.e., the two samples previously identified in the histological analysis as misclassified into groups according to the macroscopic examination of defects and another sample from the FG-C group) were considered outliers and were not kept in the differential analysis. The analysis of 21 samples was performed using a linear model and pairwise comparisons and revealed that 10,482 of the annotated genes were differentially expressed (DE) genes with a fold-change  $|FC| \geq 1.2$  in at least one of the three comparisons (adjusted p-value  $< 0.05$ ). Among these, 6,725 genes were DE between SG and FG-C, 7,887 were DE between FG-C and FG-WSWB, and 9,608 were DE between SG and FG-WSWB. The log<sub>2</sub>-transformed FC of the DE genes ranged from -3.48 to 6.64 for FG-C vs. SG, from -6.81 to 9.19 for FG-WSWB vs. SG and from -3.87 to 4.22 for FG-WSWB vs. FG-C, indicating the presence of substantial gene expression differences between these groups.

The top 10 DE genes in the three comparisons based on adjusted p-value and log<sub>2</sub> FC are presented in Table 2 and Additional file 2, respectively. These genes were mainly involved in the extracellular matrix, collagen fibrils and cytoskeleton organization, muscle contraction, the inflammation response, calcium homeostasis, oxidoreductase activity and angiogenesis. A hierarchical clustering was applied to the list of 10,482 DE genes with an  $|FC| \geq 1.2$  to group them into clusters according to their expression profile. A modular height cut-off value in the hierarchical tree allowed the identification of six clusters of DE genes that showed

similar profiles of expression within clusters and a clear discrimination among the three groups (Figure 2A). The number of genes and the expression profile of each cluster is presented in Figure 2B. Clusters c1 and c4, which represented 12% of the DE genes, discriminated SG from FG muscles (regardless of the presence of defects). In all, 79% of DE genes were found in clusters c2 and c5, which were associated with both growth rate variations and the severity of defects. The expression of the 3,117 DE genes in cluster c5 gradually increase, while that of the 5,168 DE genes belonging to cluster c2 decreased from SG to FG-C and FG-C to FG-WSWB. Among all DE genes, only 9% appeared to be linked to the presence of severe WS and WB defects and were either expressed at higher levels (cluster c6) or lower levels (cluster c3) in the FG-WSWB group than in the FG-C and SG groups.

### **Functional analysis of DE genes**

All expressed genes on the array were annotated by Gene Ontology for Biological Process (BP) based on NCBI EntrezGene chicken IDs (taxonomic id: 9031) and orthologues. Among the 12,272 expressed genes on the array, 6,232 were annotated with at least one BP GO term (51%). The enrichment analysis was performed independently for each DE genes cluster with all expressed genes used as the background (Additional file 3). Two hundred and sixty-seven GO terms were enriched in at least one cluster ( $p$ -value  $< 0.01$ ), and 264 were unique, indicating that clusters of genes were very specific and different from each other (Table 3). The number of enriched GO terms in each cluster varied between 8 (cluster c3) and 128 (cluster c5).

### **Co-expression network analysis and module-trait relationships**

The histological study identified fine phenotypes to accurately quantify the degree of muscle damage and significantly improve diagnosis, which is currently based on visual notation or

muscle palpation after slaughter. Thus, studying the correlations between gene expression levels and histological quantitative phenotypes using gene network construction served as a complementary approach to the differential analysis. Moreover, this approach made it possible to make no a priori conclusions about the groups since it was based on continuous phenotypic variables and thus kept all the samples (n=24) and took into account the variability in cell disorders highlighted at the histological level in the correlation analysis. From the normalized gene expression matrix, a weighted correlation network analysis (WGCNA) was performed to investigate the relationship between modules of co-expressed genes and histological traits and identify candidate biomarkers of the defects. Only the histological phenotypes allowed us to discriminate muscles severely affected by WS and WB from the two other groups based on, i.e., collagen VI and adipose tissue contents, the number of capillaries and fibre size variation (Table 1) were kept for this analysis. Fifteen co-expression modules containing 50 to 6516 genes were constructed. In Additional file 4, correlations between eigengenes and quantitative phenotypes show that several modules are related to one or more histological traits. We chose to focus on modules that had a mean gene significance (i.e., mean of correlations between gene expression and phenotype, GS) greater than 0.5 (Additional file 5) and absolute value of the module-histological trait correlation higher than 0.7 (Additional file 4). Hence, the light green (55 genes), royal blue (140 genes), brown (6516 genes), black (420 genes), and blue (3393 genes) modules were selected for further analysis. The light green module was strongly positively related to collagen VI content (0.89) and to variation in fibre size (0.85) but negatively related to the number of capillaries (-0.71). Brown and royal blue modules were negatively related to collagen VI content (-0.87 and -0.76, respectively) but strongly positively related to the number of capillaries (0.73 and 0.79, respectively). The blue module was negatively related to collagen VI content (-0.79) and variation in fibre size (-0.74), while the black module was positively correlated with variation

in fibre size (0.84). Interestingly, no module was highly correlated with adipose tissue content.

Genes for which expression was both highly correlated with a histological phenotype ( $GS \geq 0.7$ ) and significant modules eigengene (Module Membership,  $MM \geq 0.7$ ) were considered hub genes. Hence, 4,894 hub genes were associated with collagen VI labelling, 1,456 with the number of capillaries and 915 with variation in fibre size.

### **Identification of candidate biomarkers for severe myopathies**

Genes that were DE between FG-C and FG-WSWB muscles (adjusted p-value  $< 0.05$ ) and hub genes identified in the weighted correlation network analysis were combined in a Venn diagram to identify the most confident biomarkers related to muscle disorders involved in severe WS and WB pathologies (Figure 3).

Among the 6,418 DE genes between FG-C and FG-WSWB muscles, more than one-third (36%) were not found to be strongly correlated with any of the three histological phenotypes studied. The vast majority of hub genes were DE between FG-WSWB and FG-C muscles. Only 17, 4, and 8% of hub genes that were related to collagen, number of capillaries, and variation of the fibre size, respectively, were not DE between FG-WSWB and FG-C muscles. Among the 7,679 genes included in the Venn diagram, 17 were common among all the lists, 1,611 (21%) between 3 lists, and 2,731 (36%) between two lists. Except for the 17 genes that were common to all the lists, no gene was common between the lists of genes correlated with the number of capillaries and variation in fibre size or between the lists of genes correlated with each of the three histological phenotypes. A total of 548 genes were common between the list of genes related to collagen VI and variation in fibre size, of which 527 were DE between FG-WSWB and FG-C muscles. Finally, 1,336 genes were highly correlated with



both collagen VI and the number of capillaries, of which 1,084 were DE between FG-WSWB and FG-C muscles.

### **Validation using RT-qPCR for a subset of genes**

Among the genes found to be DE among the groups, a subset of 12 genes was chosen for validation by RT-qPCR. Genes were selected according to several criteria, including their functional role, their belonging to clusters, and, for some of them, their location within QTL regions recently identified for WS defect in broiler chickens<sup>18</sup>. The expression level of DE genes obtained by RT-qPCR was compared with expression obtained by microarrays. For each tested gene, the DE between groups observed on the microarray was confirmed with the exception of one gene, *LRSAMI*, the expression of which was only slightly correlated between RT-qPCR and microarray results (0.34). Except for this gene, expression measured by RT-qPCR and microarray was highly correlated, as shown by Pearson's correlation coefficients between 0.71 and 0.99 (Figure 4). Moreover, the gene expression values between groups obtained by qPCR were consistent with the categorization of these genes to different clusters.

Among the identified genes, the expression of the myosin heavy chain 15 (*MYH15*), which is involved in the contraction, development, and regeneration of avian skeletal muscles<sup>24</sup>, was dramatically higher ( $\times 771$ ) in FG-WSWB than in SG muscles, while the difference between FG-C and SG muscles was much less dramatic ( $\times 60$ ). As for *MYH15*, fibronectin 1 (*FNI*) expression was the highest in FG-WSWB and the lowest in SG, but the difference between the FG groups was much lower than that for *MYH15*. Platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*), collagen type VI alpha 3-chain (*COL6A3*) and leucine-rich repeat and sterile alpha motif-containing 1 (*LRSAMI*) were expressed at significantly highest levels in FG-WSWB than in FG-C and SG muscles. Conversely, the expression levels of adult

(*MYH1E*) and neonatal (*MYH1F*) myosin heavy chain isoforms were lower in the FG-WSWB group than in the SG and FG-C groups. Other genes varied between the slow-growing and fast-growing groups, regardless of the presence of WS and WB defects. This was the case for caveolin 3 (*CAV3*) and embryonic myosin heavy chain isoform (*MYH1B*), whose expression was higher in FG muscles, and for myocardin (*MYOCD*), calpain 3 (*CAPN3*) and protein phosphatase-1 regulatory subunit 3A (*PPP1R3A*), whose expression was lower in FG muscles than in SG muscles.

## **Discussion**

In recent years, the broiler industry has faced the emergence of serious meat quality defects, such as WS or WB, which affect both the competitiveness and the image of poultry production. Although research has intensified on this subject in recent years, the aetiology of WS and WB defects is still not understood except that it is now well-established that WS and WB conditions relate to an abnormal extent of connective and adipose tissue, which is associated with muscle fibre necrosis and regeneration processes<sup>2,4</sup>. One hypothesis is that these processes are the result of a long-term effect of genetic selection and intensification of production methods that have led to huge progress in terms of broiler growth and breast muscle development, which have also likely reached physiological limits. A comparison of muscles obtained from slow-growing chickens with muscles obtained from fast-growing broilers either affected or not affected by WS and WB defects allowed us to specify structural and metabolic changes that result from the long-term selection of growth in among those involved in the onset of severe myopathies (Additional file 3).

### **Long-term effects of selection on muscle structure and metabolism**

Clusters c1 and c4 include genes whose expression in muscle has been altered either positively or negatively in response to long-term selection for growth (SG  $\neq$  FG-C) but were not associated with the occurrence of WB and WS syndromes (FG-C = FG-WSWB). Their functions relate to non-specific biological processes and general functions, such as metabolic processes, signal transduction and the immune system (Table 3). Among these genes, those participating in the “positive regulation of glycogen metabolic process” (GO:0070875, Additional file 3) function were expressed at lower levels in FG than in SG muscles, suggesting a decrease in the use of glycogen in fast-growing muscles independent of the presence of WS and WB defects. This finding is consistent with previous studies that clearly demonstrated the negative impact of selection for growth and/or breast meat yield on muscle glycogen content<sup>25,26</sup>. Among the genes likely to be involved in such changes, we identified *PPP1R3A*, whose expression was much lower in FG than in SG muscles (Figure 4), as an important actor. *PPP1R3A* encode a muscle-specific regulatory subunit of protein phosphatase 1, which binds glycogen with high affinity, activates glycogen synthase, and inhibits glycogen phosphorylase. It has been reported that the overexpression of *PPP1R3A* leads to increased glycogen content<sup>27</sup>, while its KO results in a drastic reduction (90%) in the glycogen content in muscle<sup>28</sup>. Moreover, *PPP1R3A* was recently identified as the most interesting candidate gene for a major QTL region for ultimate pH (pHu)<sup>29</sup> that reflects muscle glycogen reserves<sup>30</sup>. The depletion of glycogen reserves in the muscle of fast-growing lines could lead to a predisposing metabolic environment favourable to the development of myopathic syndromes. Indeed, many studies have reported that the occurrence of WS and WB defects is often associated with high meat ultimate pH<sup>3,5,17,31-33</sup> or low muscle glycogen content<sup>19,34</sup>. Consistent with these findings, the occurrence and severity of WS were higher in a broiler line selected for high ultimate pH (pHu+) than in its counterpart selected for low ultimate pH (pHu-)<sup>17</sup>. Moreover, in a recent genetic study, several QTL-controlling WS were

identified in the pHu+ line but not in the pHu- one<sup>18</sup>, suggesting a possible interaction between the genetic control of WS and the metabolic status of muscle.

In addition to a decrease in glycogen stores, it has been shown that the haem pigment content of muscles also decreases with selection for growth and breast meat yields<sup>25</sup>, probably indicating that there is less muscle vasculature in fast than in slow-growing lines. In the present study, we observed that the expression of *MYOCD* was 3-fold lower in FG than in SG muscles. *MYOCD* is involved in extracellular matrix modelling and expressed in smooth muscle cell-containing tissues, in which it may play a crucial role in the differentiation of the smooth muscle cell lineage and vascularization. Interestingly, *MYOCD* was also recently identified in two different studies of QTL regions that control breast muscle yield<sup>35</sup> and WS occurrence<sup>18</sup> in slow- and fast-growing chicken lines, respectively. In parallel with the decrease in the expression of *MYOCD* observed in FG muscles (affected or not affected by defects), we report that compared to SG muscles, in FG muscles, there was a strong increase in the fibre surface supplied by one capillary (Table 1). Although this parameter was similar between FG-C and FG-WSWB chickens, we found that the extension of endomysial and perimysial connective tissues observed in the latter moved the capillaries away from the fibre membrane (Figure 1D-F). This could be an aggravating factor that could further lower oxygen and nutrient supply to fibres in muscles affected by WS and WB defects.

Altogether, our observations formally demonstrate a recurrent assumption presented in the literature<sup>2,19,26,36</sup>, namely the suggestion that increasing breast muscle weight and yield *via* selection through hypertrophy of existing fibres has led to a lower capillary density. This may have led to an inadequate supply of oxygen and nutrients to the muscle fibres, which likely promotes the excessive use of glycogen and probably increases oxidative stress in fast-growing muscles.

In the present study, we also observed that *CAPN3* is expressed at 3-fold lower levels in FG than in SG muscles (Figure 4). *CAPN3* is an intracellular protease specific to muscle that is involved in the calcium-dependent proteolytic system. A deficiency in this enzyme results in sarcomere disorganization and muscular limb-girdle muscular dystrophy type R1 (LGMDR1 calpain3-related) in humans<sup>37</sup>. In mice, its expression decreases following muscle denervation or denervation-devascularization injury, which induces muscle degeneration and regeneration<sup>38</sup>. Its lower expression in FG muscles is more consistent with the lower amount of vasculature observed in this line, as atrophy induced by denervation was not observed in such muscles. Although the embryonic myosin heavy chain isoform *MYH1B* is normally no longer expressed in adult muscle, its expression was increased in FG muscles (Figure 4) and was one of the top 10 DE genes between the FG-C and SG groups (Additional file 2). The expression of *CAV3*, which plays a key role in the fusion of myoblasts into myotubes during the maturation process of muscle fibres, was also higher in FG muscles than in SG muscles. These observations support the notion that selection for growth and breast muscle yield contributes to the occurrence of degeneration-regeneration processes in FG muscles, independent of the development of WS and WB myopathies.

### **How has progressive metabolic modification due to selection resulted in myopathic disorders in broiler breast muscle tissues?**

If not directly related to myopathies, the metabolic and structural changes induced by long-term selection on growth performance and breast muscle yield and evidenced by functional analysis of clusters c1 and c4 have likely created a favourable physiological context for their onset. Clusters c2 and c5 indicate what types of biological processes are involved in the progression of myopathic defects in relation to growth variations. These two clusters accounted for almost 80% of the DE genes (Figure 2). Several genes belonging to cluster c5,

in which gene expression progressively increased from SG to FG-C and from FG-C to FG-WSWB, are involved in the generation of superoxide anion (GO:0042554, Additional file 3), a reactive oxygen species (ROS) issued from the first electronic reduction of oxygen during oxidative phosphorylation<sup>39</sup>. Among these genes, some contribute to the oxidative stress response (*ARNT*, *HIF1- $\alpha$* , *GPX8*, *ALDOC*, and *CRYAB*), and these include heat-shock proteins (*HSBP1*, *HSPA5*, *HSF2*, *HSPB7*, and *HSPH1*); these genes are known to be expressed at substantially higher levels during oxidative stress<sup>40</sup>. These results strongly support the notion that selection for growth progressively resulted in increased oxidative stress and that this process was exacerbated in fast-growing muscle affected by WS and WB. It is worth noting that elevated ROS levels contribute to human muscular dystrophies, such as Duchenne muscular dystrophy<sup>41</sup>, and that excessive ROS production alters calcium homeostasis *via* the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum and leads to skeletal muscle necrosis and atrophy<sup>42</sup>. Indeed, several genes belonging to cluster c5 (such as *P2RX4*, *ATP2B1*, *ANXA6*, *ATP2A3*, *SLC8A1*, *ANXA2*, *ATP2A2*, and *SLC24A2*) participate in calcium ion transport, indicating the possible release of calcium at the origin of muscle calcium-dependent proteolysis and tissue degeneration<sup>41</sup>, which has been reported in WS and WB muscles.

Cluster c5 includes a great number of genes involved in the production of inflammatory molecules, such as cytokines, chemokines, cell adhesion molecules and tissue-degrading enzymes. They are grouped into several GO terms, including “inflammatory response” (GO:0006954), “positive regulation of cytokine secretion” (GO:0050715), “regulation of cytokine-mediated signalling pathway” (GO:0001959), “regulation of interleukin-1 secretion” (GO:0050704), “positive regulation of interleukin-12 production” (GO:0032735), and “positive regulation of tumour necrosis factor (TNF) production” (GO:0032760) (Additional file 3). TNF is a multifunctional proinflammatory cytokine, and one of its isoforms (i.e.,

*TNFAIP6*) was in the top 10 DE genes between the FG-WSWB and FG-C groups (Table 2, Additional file 2). It induces the expression of metalloproteinases, which are known to degrade several components of the extracellular matrix-cytoskeleton linkage in skeletal muscle and to thereby lead to extracellular alterations and myopathy<sup>42</sup>. Among the 14 matrix metalloproteinases included on the microarray, seven belong to cluster c5 (*MMP2*, *MMP10*, *MMP14*, *MMP16*, *MMP17*, *MMP24*, *MMP27*, and *MMP23B*). Consistent with the increase in the inflammatory response found in cluster c5, we observed the activation of the immune system cascade. This included 20% of the genes in cluster c5, with one of the three most significant functions the “innate immune response” (GO:0045087, Additional file 3). We identified several chemokines, cell adhesion molecules and extracellular proteasomes that can favour the infiltration of macrophages, lymphocytes and neutrophils. Such infiltrations, observed in cases of muscle injury, are also frequently observed in muscles affected by WS and WB<sup>1,2,4,14,43</sup>. There are also several cytokines that are produced during the inflammatory response, such as *TNF- $\alpha$*  or *IL-6*, that play an important role in muscle regeneration. *TNF- $\alpha$*  attracts muscle satellite cells to the damaged site, promotes satellite cell proliferation by activating NF- $\kappa$ B signalling, and stimulates differentiation by activating the p38 signalling pathway. *IL-6* stimulates the migration, proliferation and differentiation of myoblasts<sup>44</sup>. After injury, muscle regeneration mediated by muscle stem cells is switched on. Muscle stem cells (or satellite cells) are the major contributors to muscle regeneration and remain quiescent under normal conditions<sup>44</sup>. After muscle trauma, they are activated, giving rise to a proliferative myoblast population that differentiates to restore damaged myofibres. The “regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation” (GO:0014842, Additional file 3) was significantly enriched in cluster c5. It includes genes involved in the activation of muscle satellite cell proliferation (*FGF2*, *SDC4*, *GPC1*, *PAX7*, and *STAT3*), indicating the activation of the muscle repair process. This is consistent with the decrease observed in the expression of

the adult and neonatal myosin heavy chain isoforms, *MYH1E* and *MYH1F*, which belong to cluster c2, and the increase observed in the expression of *MYH15*, which is involved in the regeneration of avian skeletal muscles<sup>24</sup> and was one of the top 10 DE genes in the three comparisons (Additional file 2). Moreover, cluster c5 also included several genes that contribute to collagen formation (GO:0032964, GO:0032967, GO:0030199), the GO term “collagen fibril organization” being one of the three most enriched terms of this cluster (Additional file 3). All these observations were consistent with our histological study that showed that there was an increase in both the relative surface occupied by collagen VI across SG, FG-C and FG-WSWB muscles and the coefficient of variation of fibre size for FG-WSWB muscles compared to the other groups (Table 1). Collectively, our molecular and histological observations support the hypothesis that regeneration processes are more activated in fast than in slow-growing muscles, with this phenomenon exacerbated in muscles affected by WS and WB (Figure 4).

Functional analysis of clusters c2 and c5 also revealed several enriched GO terms related to energetic pathways, especially glycogen metabolism, glucose use, cellular respiration and ATP production (Additional file 3). This finding reveals that there was a progressive decrease (SG > FG-C > FG-WSWB) in the expression of genes encoding glycolytic enzymes (*PFKM*, *ALDOB*, *TP11*, *GAPDH*, *PGK1*, *PGAM1*, *ENO3* and *PKM*), suggesting a lower level of anaerobic glycolytic activity, which is already observed in muscles affected by WS and WB<sup>11,19,34,45</sup>. This decrease in anaerobic glycolytic activity is concomitant with an alteration in mitochondrial cellular respiration. Indeed, several genes belonging to cluster c2 (SG > FG-C > FG-WSWB) were related to “cellular respiration” (GO:0045333), “aerobic respiration” (GO:0009060), “ATP synthesis coupled electron transport” (GO:0042773), and “mitochondrial respiratory chain complex I and IV assembly” (GO:0032981-GO:0033617) metabolic processes (Additional file 3). These genes are primarily involved in the production



of electron transport chain components in mitochondria (*CYCS*, *COX16*, *SCO1*, *SURF1*, *TIMM21*, *BCS1L*, *FOXRED2*...) and the Krebs cycle (*ACO2*, *PDHB*, *MDH1*, *MDH2*, *PDHA1*). Moreover, several genes belonging to cluster c5 (SG < FG-C < FG-WSWB) are involved in carbohydrate metabolic processes, such as gluconeogenesis (*FBP1*, *PCK2*, *GALE*, and *ALDOC*), carbohydrate derivative transport, nucleotide-sugar biosynthesis, the pentose phosphate pathway (*RBKS*, *RPE*, *TKT*, *ALDOC*, *DERA*, *FBP1*, *PGD*, and *PGM2*) and glycogenolysis (*GCG*, *INPP5K*). All these results clearly indicate that selection by itself has markedly modified the metabolic pathways used to produce energy in muscles and that these metabolic modifications are even more pronounced in muscles affected by WS and WB. This metabolic reorientation may be related to the progressive decrease in carbohydrate (especially glycogen) availability that has accompanied selection for growth and breast meat yield<sup>25,26</sup> and that is also observed in muscles affected by WS or WB<sup>5,21,34</sup>. It is likely that these metabolic modifications have contributed to the appearance of muscle disorders in fast-growing birds. Indeed, it was recently shown that muscles exhibiting a heightened ability to store glycogen used carbohydrates as the main source of energy, whereas those lacking glycogen used energy produced from amino acid catabolism and lipid oxidation, leading to an adaptive response to oxidative stress and muscle regeneration processes<sup>21,46</sup>.

### **Mechanisms of cellular defence and remodelling are specifically involved in case of severe myopathies**

Functional analysis of clusters c3 and c6 highlighted the biological processes specifically activated in fast-growing muscles that are severely affected by WS and WB. Genes belonging to these clusters account for 9% of the total DE genes. Cluster c6 contained genes that are overexpressed in cases of severe WS and WB. Its most enriched GO term is related to oxygen transport (GO:0015671, Additional file 3) and encompasses genes encoding for oxygen

carriers (*HBE*, *HBBA*, *HBM*, *HBA1*, and *HBBR*), likely indicating insufficient oxygen supply in muscles. Another group of functions relates to glycosaminoglycan and proteoglycan synthesis (“protein O-linked glycosylation *via* threonine” (GO:0018243) and “proteoglycan metabolic process” (GO:0006029)), which are both components of fibrous tissue (Additional file 3). This is fully in agreement with histological observations that showed significant infiltration and extension of connective tissues within muscles (Figure 1). At the molecular level, we noticed a strong increase in FG-WSWB muscles of that expressed *PDGFRA* (Figure 4), a marker of fibro-adipogenic precursors (FAPs), which were recently characterized as playing a role in muscle regeneration and repair processes. Indeed, FAPs differentiate into fibroblasts and adipocytes under pathological conditions, such as muscular dystrophy, leading to connective and fat tissue infiltration<sup>47</sup>. Similarly, the expression of *COL6A3* and *FNI*, which respectively contribute to the formation of collagen VI and are found in most connective tissues, fibres and extracellular matrix (ECM) during tissue repair after degeneration, were expressed at substantially higher levels in FG-WSWB muscles (Figure 4), in accordance with the high proportion of ECM that characterizes these muscles. *FNI* was also one of the top 10 DE genes between FG-WSWB and FG-C (Table 2).

Interestingly, cluster c6 was associated with several GO terms related to neurogenesis, such as “positive regulation of neurogenesis” (GO:0050769), “axonogenesis” (GO:0007409), “neuron differentiation” (GO:0030182), “positive regulation of synapse assembly” (GO:0051965), “regulation of neuron differentiation” (GO:0045664), and “neuron projection extension” (GO:1990138) (Additional file 3). Genes belonging to these functions are mostly involved in axon guidance and the formation or maintenance of neuromuscular junctions (such as *AGRN*, *SLIT2*, *SEMA3A*, *EPHB3* and *NTRK2*). This is likely more a sign of the involvement of neuromuscular junction maintenance and repair than of motor neuron injury, which would result in foci containing atrophic fibres<sup>48</sup>, which were not observed in FG-WSWB muscles.

Indeed, because neuromuscular junction structure alterations occur in affected muscles, axons would need to be attracted and redirected to neuromuscular junctions. Many factors that promote myofibre regeneration and repair, such as semaphorin 3A (*SEMA3A*), which is expressed by satellite cells in injured muscle, also serve as promoters of axonal sprouting and guidance and neuromuscular junction repair as nerves grow towards newly regenerated myofibres<sup>49</sup>. If cluster c6 is associated with the activation of several mechanisms, such as oxygen transport, axon guidance, and neuromuscular junction repair, then in the case of severe myopathy, cluster c3 could be associated with limitations in the development of cellular defence systems. Indeed, it contains genes whose expression is downregulated in muscles affected by WS and WB, with some of these genes participating in apoptosis and cytokinesis, two processes involved in cell defence or survival. This could be a sign that these cells fail to develop effective mechanisms of regeneration, and this defect is probably responsible for the substantial alteration of the structure of muscle and muscle functions observed in muscles severely affected by WS and WB.

### **Identification of quantitative histological phenotypes and molecular markers for the diagnosis of muscle disorders in chicken**

Our study, like other recent studies<sup>19,20,22,35</sup>, helps to advance our understanding of the biological processes that are involved in the development of myopathies in the breast muscle tissues of modern broiler lines. It also provides several finely defined histological phenotypes, which were used to precisely quantify the degree of muscle damage and significantly improve diagnosis, which is currently based on visual or palpation scoring of muscle after slaughter. The study of these fine histological phenotypes helps researchers to better describe the major structural changes that occur in muscles affected by WS and WB, and we also used them to determine, through a combination of DE analysis and weighted correlation network analysis,

the most confident molecular markers related to muscle disorders involved in severe WS and WB pathologies (Figure 3).

This led to a set of 17 relevant biomarkers that were DE between the FG-C and FG-WSWB groups and highly correlated with histological phenotypes related to myopathy (Table 4).

Three of these genes have not yet been characterized. Among the others, most are involved in muscle regeneration phenomena (*PDLIM1*), fibrosis (*COL6A2*), hypoxia (*ARNT2*, *HIF1AN*, and *PTGS1*) and axon guidance (*CADM1*, *SLIT3* and *NAV3*). These functions are the main biological processes that are specifically activated in fast-growing muscles severely affected by WS and WB defects (see the functional annotation of clusters c3 and c6). We also propose to enrich this set of biomarkers by 5 additional genes (*MYH15*, *FNI*, *COL6A3*, *MYHIE*, and *MYHIF*) that were strongly DE between the FG-C and FG-WSWB groups, were highly correlated to two of the three histological phenotypes studied, and were located in the QTL region controlling the WS defect in the breast muscle tissues of chicken<sup>18</sup> (Table 4). Among these five genes, *MYH15* was the only one that was highly correlated with the number of capillaries. This slow-type myosin, also called ventricular myosin in chicken because it is mainly expressed in heart, is transiently expressed in embryonic chick skeletal muscles and then re-expressed during muscle regeneration<sup>24</sup>. Interestingly, it is associated with bovine pulmonary hypertension related to high altitude, suggesting that *MYH15* could be involved in the response to hypoxic conditions<sup>50</sup>. The ability of this set of 22 genes to discriminate muscles with severe myopathies from non-affected muscles should now be tested in larger populations obtained from different genetic backgrounds.

In conclusion, the present study provides new information on the biological processes that lead to the occurrence of severe myopathy in the breast muscles of modern broiler lines. By comparing slow-growing to fast-growing muscles that were affected or not affected by

myopathies, we were able to specify molecular pathways that were altered by the long-term selection of growth performance to those directly involved in the development of muscle disorders. Our data show that selection for fast growing and breast meat yield has progressively led to inadequate supplies of oxygen and the nutrients that promote carbohydrate depletion in muscle. Such changes provided favourable conditions for metabolic modifications that shift cells toward use of alternative catabolic pathways to produce energy, leading to an adaptive response to oxidative stress and the first signs of inflammatory, regenerative and fibrotic processes. All these processes are dramatically intensified in muscles affected by myopathies, as are new mechanisms related to cellular defence and remodelling to allow the muscles to function (oxygen transport, neurogenesis). Finally, our study highlights the fine histological phenotypes and genes that have expression profile that are highly correlated with muscle disorders involved in the development of myopathies, thus opening new perspectives for a more fine diagnosis and a better screening tool for broilers affected these such defects.

## **Methods**

### **Animals, sample collection, muscle and meat quality measurements**

The present study was carried out on *pectoralis major* muscles obtained from two chicken genotypes: an experimental slow-growing (SG) chicken line selected by INRA and a grand-parental commercial modern fast-growing (FG) line highly selected for growth and breast muscle yield. Birds of the two genotypes were reared following standard rearing practices, had *ad libitum* access to feed and water and were slaughtered at 6 weeks of age at the PEAT experimental unit (INRA, Centre Val de Loire, Nouzilly, France). The slaughter and carcass processing conditions of the FG broilers are fully described in Alnahhas et al.<sup>51</sup>. Samples of the *pectoralis major* muscle were collected fifteen minutes after slaughter and either directly

snap-frozen in liquid nitrogen for molecular analysis or stored in isopentane cooled with liquid nitrogen for histological purposes. All muscle samples were then stored at -80 °C until further analysis. One day after slaughter, three trained people visually graded *pectoralis major* muscles for WS and WB. Both WS and WB were categorized separately on a three-point scale: 0 = absence of defects, 1 = moderate severity of defects, and 2 = high severity of defects. Defects were scored according to the widths of white stripes based on the scale of Kuttappan et al.<sup>6</sup> for WS in addition to visual characteristics and hardness on palpation for WB.

Body composition was characterized for all SG and FG birds through the measurement of *pectoralis major* yield (PMY) expressed in relation to body weight (BW). Breast meat yield (BMY), abdominal fat yield (AFP), and *pectoralis minor* yield (PmY) were also measured in FG birds as were several breast meat quality traits that were evaluated in *pectoralis major* muscle: ultimate pH (pHu) and the colour parameters L\*, a\*, b\*, which were measured 24 hours post-mortem, drip loss (DL) during a 4-day storage period, cooking loss (CL), Warner Bratzler shear force (SF) of cooked meat, curing-cooking yield (CCY) and the thiobarbituric acid-reactive substance index (TBA-RS), used as markers of lipid peroxidation and measured after 8 days of storage. All these measurements were obtained as described in Alnahhas et al.<sup>17</sup>.

Three groups of eight animals were selected for further molecular and histological analyses: eight animals obtained from the SG line and two groups of eight animals selected from among the 200 FG birds according to their extreme visual score for WS and WB defects and DL, CL and CCY phenotypes. The 8 FG-C birds were visually free of any defects and exhibited the highest water-holding capacity, and the 8 FG-WSWB birds were affected by both the WS and WB defects (average score of 2 for both WS and WB) and exhibited poor water-holding capacity.

## **Histochemical traits**

Immunohistochemistry was performed on 10 µm-thick *pectoralis major* muscle cross-sections obtained from the FG-C, FG-WSWB and SG groups. All primary antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH, maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, and developed by Douglas M. Fambrough, as follows: 39 (anti-collagen VI), B3/D6 (anti-fibronectin), and 31/31-2 (anti-laminin). Secondary antibodies and conjugated streptavidin were obtained from Southern Biotech, Birmingham, AL, USA, as follows: goat anti-mouse IgG1 conjugated to a TR antibody, goat anti-mouse IgG H+L conjugated to a biotin antibody, and streptavidin conjugated to Cy2. The washing procedure consisted of incubating cross-sections for 3 × 5 minutes in phosphate-buffered saline solution. Slides were mounted in Mowiol medium (Sigma, Lyon, France) and stored at 4°C in a dark chamber before they were observed. Whatever the labelling procedure, six images per sample were selected randomly (captured at 10× and/or 20× magnification using a Leica MC170 camera; Leica Microsystems, Nanterre, France) on a Leica DMRB microscope.

## ***Fibrosis and adiposis quantification***

The Collagen VI-Bodipy co-labelling procedure was used to quantify the extension of connective and adipose tissues within muscle. Muscle cross-sections were fixed with 4% paraformaldehyde solution, incubated in 10% goat serum (Sigma, Lyon, France) for 30 minutes, and then incubated with primary Collagen VI antibody (1/200) for 2 hours. After the tissues were washed, muscle cross-sections were incubated with a secondary goat anti-mouse IgG1 conjugated to a TR antibody (1/500) for 1 hour, washed again, and incubated with Bodipy 493 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene, 1/3000, Sigma, Lyon, France) for 15 minutes. The relative surface areas labelled with collagen VI and

Bodipy were quantified using the Area Fraction Parameter function in ImageJ software after transformation into black and white images (8-bit) and threshold adjustment.

### ***Capillary density and fibre size measurement***

A fibronectin-laminin co-labelling procedure was used to label capillary membranes (fibronectin) and basal lamina surrounding muscle fibres (laminin). Muscle cross-sections were incubated in 10% goat serum for 30 minutes and with primary fibronectin antibody (1/100) for 1 hour. After they were washed, cross-sections were incubated with secondary goat anti-mouse IgG H+L conjugated to biotin antibody (1/1000) for 45 minutes, washed, and incubated with streptavidin conjugated to Cy2 (1/500) for 45 minutes. After they were washed, the cross sections were incubated with primary laminin antibody (1/50) for 1 hour, washed, and finally incubated with secondary goat anti-mouse IgG1 conjugated to a TR antibody (1/1000) for 45 minutes. Capillaries were counted manually, and fibre size was determined using the minimum Feret's diameter parameter function of the ImageJ software after transformation into black and white images (8-bit) and threshold adjustment.

### **Microarray expression profiling**

#### ***RNA extraction***

Total RNA was extracted from *pectoralis major* muscle samples using the RNeasy® Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Residual genomic DNA was removed by DNase I treatment (Qiagen, Valencia, CA, USA). RNA concentration was measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and RNA integrity was checked according to an RNA Integrity Number (RIN > 8) using RNA 6000 Nano chips run on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

#### ***Labelling and hybridization***



Muscle transcriptional profiling was performed using an 8 × 60K Agilent Gallus gallus custom-commercial array (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) containing 61,657 probes (Platform GPL20588 in the U.S. National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO) microarray database). RNA labelling and microarray processing were performed by the @BRIDGE platform (INRA, UMR GABI, Jouy-en-Josas) using the procedure described in Jacquier et al.<sup>52</sup>. The microarray datasets were submitted to the GEO microarray database with the accession number GSE127806.

### ***Re-annotation of the microarray chip on the current Galgal5 chicken genome***

To compare the DE genes identified in this study and the genetic markers of WS provided by our previous study<sup>18</sup>, we re-annotated the chip.

The transcriptome alignment on the Galgal5 chicken assembly (EntrezGene database) of all the probes deposited on the chip was carried out using the *blastn* algorithm (hybridization tolerance of two mismatches and a single probe-associated gene as parameters), which is available in the BLAST + suite (ncbi-blast-2.6.0 +)<sup>53</sup>, on the cluster obtained from the Genotoul bioinfo platform (<http://bioinfo.genotoul.fr/>). Probes were annotated on a Galgal5 assembly as reported in Additional file 6.

Probes with a hybridization tolerance of two mismatches and a single probe-associated gene were considered correctly annotated and were kept for further analysis.

### ***Differential expression analysis***

First-step filtering was applied to keep only those probes that were expressed in this study (43,688 probes). The fluorescence signal for each probe was log<sub>2</sub>-transformed and normalized by median centring for each array. The differences in expression among the three groups (SG, FG-C, and FG-WSWB) were computed using the log<sub>2</sub> transformation of the fold-change (log<sub>2</sub>FC). The differential analysis was performed using a linear model to identify DE probes among all pairwise comparisons of the three groups implemented in R package limma

version3.32.7 (Linear Model for Microarray Data)<sup>54</sup>. The p-values were adjusted for multiple testing by the Benjamini-Hochberg method<sup>55</sup> to control the False Discovery Rate (FDR).

Probes were considered DE when the adjusted p-value was  $\leq 0.05$ .

### ***Hierarchical clustering***

To identify clusters of DE genes, hierarchical clustering was performed on the gene expression matrix. The correspondence between expressed probes and annotated genes was determined using the re-annotation of the chip. Genes with at least one Galgal5 annotated DE probe,  $|FC| \geq 1.2$  and the highest mean expression probe level in one of groups were kept. Normalized expression (after log<sub>2</sub>-transformation) was scaled for each gene. Hierarchical clustering on the scaled gene expression matrix was based on the Pearson correlation distance and an average link aggregation distance. A modular height cut-off value in the hierarchical tree obtained using the `cutreeDynamic` function of `dynamicTreeCut` package<sup>56</sup> (with the following parameters: `deepSplit=1`, `minClusterSize=300`) was applied to identify clusters of DE genes that shared similar expression profiles across the three groups (FG-C, FG-WSWB and SG).

### **Functional enrichment analysis**

All the genes expressed on the chip were annotated by Gene Ontology<sup>57,58</sup> for Biological Process categories according to the NCBI EntrezGene database using orthologues. Functional enrichment tests were performed using the ViSEAGO R package, which is available at <https://forgemia.inra.fr/umr-boa/viseago>. Enrichment for functions within each cluster of genes was tested using a Fisher's exact test and the "elim" algorithm ( $p < 0.01$ ) with all expressed genes used as the background.

### **Co-expression network analysis**

To study the correlations between gene expression levels and histological quantitative phenotypes as a complementary approach to the differential analysis, we applied a co-expression analysis using the R package Weighted Correlation Network Analysis (WGCNA)<sup>59</sup>.

### ***Network construction***

The co-expression analysis was performed using an expression matrix based on the 24 samples and 11,999 expressed and annotated genes. The unsigned connected network was built based on the adjacency matrix between genes. From the gene expression matrix, Pearson's correlations between every pair of genes were computed and raised to a selected power of  $\beta=7$  using the `pickSoftThreshold` function to reach a scale-free topology index ( $R^2$ ) of at least 0.60. The adjacency matrix was turned into a Topological Overlap Measure (TOM) matrix, which can be used to assess the degree of shared neighbours between pairs of genes.

### ***Module detection***

A hierarchical clustering of the genes based on the TOM dissimilarity measure followed by a modular height cut-off value of branches in the hierarchical tree using the `cutreeDynamic` function (`deepSplit=4`, `minClusterSize=30`) was performed to detect modules of co-expressed genes. The module eigengene, which was the first principal component of each module and represented the expression value of each module, was calculated. Modules with expression profiles that were very similar (correlation = 0.90) were merged since there was a high probability that genes belonging to these modules are highly co-expressed.

### ***Module-trait relationships***

Only the histological phenotypes that allowed discrimination of muscles severely affected by WS and WB from other muscles (i.e., collagen VI labelling, adipose tissue, number of capillaries and coefficient of variation of fibre size) were kept for the analysis. The module eigengene was used to detect biologically relevant modules. Indeed, module-trait relationships

were estimated using Pearson's correlation between the module eigengene and the trait of interest.

Genes for each module with high Gene Significance ( $GS \geq 0.7$ ) corresponding to the absolute value of the correlation between gene expression and the histological trait and high Module Membership ( $MM \geq 0.7$ ), which was defined as the absolute value of the correlation of the module eigengene and the gene expression profile, were defined as hub genes.

### **Validation by RT-qPCR**

To validate the results obtained on the microarray, RT-qPCR was performed to examine the relative expression of 12 genes selected according to several criteria, including their functional role, their belonging to each of the identified clusters, and, for some of them, their location within QTL regions recently identified as controlling the WS defect in broiler chickens<sup>18</sup>. Total RNA was extracted from *pectoralis major* muscle samples using RNA NOW (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Ten micrograms of RNA from each sample were reverse-transcribed using RNase H-MMLV reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, Illkirch, France) and random primers (Promega, Charbonnières les Bains, France). Primers targeting the studied genes were designed with Primer3 version 4.0.0<sup>60,61</sup>. The list of primer sequences is available in Additional file 7. The products of amplification were analysed by electrophoresis and further sequenced.

Gene expression was quantified by qPCR using a Roche LightCycler® 480 II (Roche Applied Science) and Takyon® mix (Eurogentec, Seraing, Belgium) according to the manufacturer's recommendations. Quantitative PCR conditions were set at 95 °C for 5 min, followed by forty-five cycles of 10 s at 95 °C, 20 s at 60 °C and 10 s at 72 °C. *18S ribosomal RNA* was used as a housekeeping gene to normalize the CT values as its expression was invariant between groups. A mix of chicken *pectoralis major* muscle cDNA served as a reference

sample (control cDNA). The calculation of absolute mRNA levels was based on the PCR efficiency and the threshold cycle (CT) deviation of an unknown cDNA versus the control cDNA according to the equation proposed by Pfaffl<sup>62</sup>.

## References

- 1 Kuttappan, V. A. *et al.* Effect of white striping on the histological and meat quality characteristics of broiler fillets. *Poult Sci* **88**, 136-137 (2009).
- 2 Kuttappan, V. A. *et al.* Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poult Sci* **92**, 331-338, doi:10.3382/ps.2012-02646 (2013).
- 3 Petracci, M., Mudalal, S., Bonfiglio, A. & Cavani, C. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poult Sci* **92**, 1670-1675, doi:10.3382/ps.2012-03001 (2013).
- 4 Sihvo, H. K., Immonen, K. & Puolanne, E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Vet Pathol* **51**, 619-623, doi:10.1177/0300985813497488 (2013).
- 5 Mudalal, S., Lorenzi, M., Soglia, F., Cavani, C. & Petracci, M. Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal* **9**, 728-734, doi:10.1017/S175173111400295X (2015).
- 6 Kuttappan, V. A. *et al.* Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poult Sci* **91**, 1240-1247, doi:10.3382/ps.2011-01947 (2012).
- 7 Kuttappan, V. A., Brewer, V. B., Apple, J. K., Waldroup, P. W. & Owens, C. M. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci* **91**, 2677-2685, doi:10.3382/ps.2012-02259 (2012).
- 8 Kuttappan, V. A. *et al.* Effect of different levels of dietary vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopherol acetate) on the occurrence of various degrees of white striping on broiler breast fillets. *Poult Sci* **91**, 3230-3235, doi:10.3382/ps.2012-02397 (2012).
- 9 Kuttappan, V. A. *et al.* Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poult Sci* **92**, 339-345, doi:10.3382/ps.2012-02647 (2013).
- 10 Petracci, M., Mudalal, S., Babini, E. & Cavani, C. Effect of white striping on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. *Italian Journal of animal Science* **13**, 179-183, doi:10.408/ijas.2014.3138 (2014).
- 11 Mudalal, S., Babini, E., Cavani, C. & Petracci, M. Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by white striping. *Poult Sci* **93**, 2108-2116, doi:10.3382/ps.2014-03911 (2014).
- 12 Tijare, V. V. *et al.* Meat quality of broiler breast fillets with white striping and woody breast muscle myopathies. *Poult Sci* **95**, 2167-2173, doi:10.3382/ps/pew129 (2016).
- 13 Lorenzi, M., Mudalal, S., Cavani, C. & Petracci, M. Incidence of white striping under commercial conditions in medium and heavy broiler chickens in Italy. *J Appl Poult Res* **23**, 754-758, doi:http://dx.doi.org/10.3382/japr.2014-00968 (2014).
- 14 Soglia, F. *et al.* Histology, composition, and quality traits of chicken Pectoralis major muscle affected by wooden breast abnormality. *Poult Sci* **95**, 651-659, doi:10.3382/ps/pev353 (2016).
- 15 Kuttappan, V. A. *et al.* Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci* **92**, 811-819, doi:10.3382/ps.2012-02506 (2013).
- 16 Bailey, R. A., Watson, K. A., Bilgili, S. F. & Avendano, S. The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. *Poult Sci* **94**, 2870-2879, doi:10.3382/ps/pev304 (2015).
- 17 Alnahhas, N. *et al.* Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genet* **17**, 61, doi:10.1186/s12863-016-0369-2 (2016).

- 18 Pampouille, E. *et al.* Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens. *BMC Genomics* **19**, 202, doi:10.1186/s12864-018-4598-9 (2018).
- 19 Mutryn, M. F., Brannick, E. M., Fu, W., Lee, W. R. & Abasht, B. Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. *BMC Genomics* **16**, 399, doi:10.1186/s12864-015-1623-0 (2015).
- 20 Zambonelli, P. *et al.* Detection of differentially expressed genes in broiler pectoralis major muscle affected by White Striping - Wooden Breast myopathies. *Poult Sci* **95**, 2771-2785, doi:10.3382/ps/pew268 (2016).
- 21 Beauclercq, S. *et al.* Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. *Sci Rep* **7**, 6447, doi:10.1038/s41598-017-06511-6 (2017).
- 22 Marchesi, J. A. P. *et al.* Whole transcriptome analysis of the pectoralis major muscle reveals molecular mechanisms involved with white striping in broiler chickens. *Poult Sci*, doi:10.3382/ps/pey429 (2018).
- 23 Papah, M. B., Brannick, E. M., Schmidt, C. J. & Abasht, B. Gene expression profiling of the early pathogenesis of wooden breast disease in commercial broiler chickens using RNA-sequencing. *PLoS One* **13**, e0207346, doi:10.1371/journal.pone.0207346 (2018).
- 24 Camoretti-Mercado, B., Dizon, E., Jakovcic, S. & Zak, R. Differential expression of ventricular-like myosin heavy chain mRNA in developing and regenerating avian skeletal muscles. *Cell Mol Biol Res* **39**, 425-437 (1993).
- 25 Berri, C., Wacrenier, N., Millet, N. & Le Bihan-Duval, E. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. *Poult Sci* **80**, 833-838, doi:10.1093/ps/80.7.833 (2001).
- 26 Berri, C. *et al.* Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. *J Anim Sci* **85**, 2005-2011, doi:10.2527/jas.2006-398 (2007).
- 27 Lerin, C. *et al.* Regulation and function of the muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 (GM) in human muscle cells depends on the COOH-terminal region and glycogen content. *Diabetes* **52**, 2221-2226 (2003).
- 28 Suzuki, Y. *et al.* Insulin control of glycogen metabolism in knockout mice lacking the muscle-specific protein phosphatase PP1G/RGL. *Mol Cell Biol* **21**, 2683-2694, doi:10.1128/MCB.21.8.2683-2694.2001 (2001).
- 29 Bihan-Duval, E. L. *et al.* Identification of genomic regions and candidate genes for chicken meat ultimate pH by combined detection of selection signatures and QTL. *BMC Genomics* **19**, 294, doi:10.1186/s12864-018-4690-1 (2018).
- 30 Le Bihan-Duval, E. *et al.* Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genet* **9**, 53, doi:10.1186/1471-2156-9-53 (2008).
- 31 Trocino, A. *et al.* Effect of genotype, gender and feed restriction on growth, meat quality and the occurrence of white striping and wooden breast in broiler chickens. *Poult Sci* **94**, 2996-3004, doi:10.3382/ps/pev296 (2015).
- 32 Dalle Zotte, A. *et al.* Effect of "Wooden Breast" appearance on poultry meat quality, histological traits, and lesions characterization. *Czech. J. Anim. Sci.* **62**, 51-57 (2017).
- 33 Kuttappan, V. A., Owens, C. M., Coon, C., Hargis, B. M. & Vazquez-Anon, M. Incidence of broiler breast myopathies at 2 different ages and its impact on selected raw meat quality parameters. *Poult Sci* **96**, 3005-3009, doi:10.3382/ps/pex072 (2017).
- 34 Abasht, B., Mutryn, M. F., Michalek, R. D. & Lee, W. R. Oxidative Stress and Metabolic Perturbations in Wooden Breast Disorder in Chickens. *PLoS One* **11**, e0153750, doi:10.1371/journal.pone.0153750 (2016).
- 35 Allais, S. *et al.* Mapping of QTL for chicken body weight, carcass composition, and meat quality traits in a slow-growing line. *Poult Sci*, doi:10.3382/ps/pey549 (2018).

- 36 Petracci, M., Mudalal, S., Soglia, F. & Cavani, C. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *World's Poultry Science Journal* **71**, 363-373, doi:doi:10.1017/S0043933915000367 (2015).
- 37 Richard, I. *et al.* Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81**, 27-40 (1995).
- 38 Stockholm, D. *et al.* Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1561-1569, doi:10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1561 (2001).
- 39 Brown, D. I. & Griendling, K. K. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* **47**, 1239-1253, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023 (2009).
- 40 Kalmar, B. & Greensmith, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 310-318, doi:10.1016/j.addr.2009.02.003 (2009).
- 41 Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Jozkowicz, A. & Dulak, J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil* **36**, 377-393, doi:10.1007/s10974-015-9438-9 (2015).
- 42 Li, H., Malhotra, S. & Kumar, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med (Berl)* **86**, 1113-1126, doi:10.1007/s00109-008-0373-8 (2008).
- 43 Ferreira, T. Z., Casagrande, R. A., Vieira, S. L., Driemeier, D. & Kindlein, L. An investigation of a reported case of white striping in broilers. *J Appl Poult Res* **23**, 1-6, doi:http://dx.doi.org/10.3382/japr.2013-00847 (2014).
- 44 Yang, W. & Hu, P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J Orthop Translat* **13**, 25-32, doi:10.1016/j.jot.2018.01.002 (2018).
- 45 Kuttappan, V. A. *et al.* Proteomic analysis reveals changes in carbohydrate and protein metabolism associated with broiler breast myopathy. *Poult Sci* **96**, 2992-2999, doi:10.3382/ps/pex069 (2017).
- 46 Beauclercq, S. *et al.* Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality. *J Proteome Res* **15**, 1168-1178, doi:10.1021/acs.jproteome.5b01050 (2016).
- 47 Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature Cell Biology* **12**, 153 - 163, doi:10.1038/ncb2015 (2010).
- 48 Boido, M. *et al.* Increasing Agrin Function Antagonizes Muscle Atrophy and Motor Impairment in Spinal Muscular Atrophy. *Front Cell Neurosci* **12**, 17, doi:10.3389/fncel.2018.00017 (2018).
- 49 McLoon, L. K. A new role for satellite cells: control of reinnervation after muscle injury by semaphorin 3A. Focus on "Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema3A during myogenic differentiation". *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C227-230, doi:10.1152/ajpcell.00256.2009 (2009).
- 50 Neary, M. T. *et al.* Myosin heavy chain 15 is associated with bovine pulmonary arterial pressure. *Pulm Circ* **4**, 496-503, doi: 10.1086/677364 (2014).
- 51 Alnahhas, N. *et al.* Selecting broiler chickens for ultimate pH of breast muscle: analysis of divergent selection experiment and phenotypic consequences on meat quality, growth, and body composition traits. *J Anim Sci* **92**, 3816-3824, doi:10.2527/jas.2014-7597 (2014).
- 52 Jacquier, V. *et al.* Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-Ionomycin. *BMC Genomics* **16**, 26, doi:10.1186/s12864-015-1218-9 (2015).
- 53 Camacho, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421, doi:10.1186/1471-2105-10-421 (2009).
- 54 Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**, e47, doi:10.1093/nar/gkv007 (2015).
- 55 Benjamini, Y. H., Y. Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B* **57**, 289-300, doi:10.2307/2346101 (1995).



- 56 Langfelder, P., Zhang, B. & Horvath, S. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. *Bioinformatics* **24**, 719-720, doi:10.1093/bioinformatics/btm563 (2008).
- 57 Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**, 25-29, doi:10.1038/75556 (2000).
- 58 The Gene Ontology, C. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Res* **45**, D331-D338, doi:10.1093/nar/gkw1108 (2017).
- 59 Langfelder, P. & Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**, 559, doi:10.1186/1471-2105-9-559 (2008).
- 60 Koressaar, T. & Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289-1291, doi:10.1093/bioinformatics/btm091 (2007).
- 61 Untergasser, A. *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, e115, doi:10.1093/nar/gks596 (2012).
- 62 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).

## **Acknowledgements**

We thank the @BRIDGE platform (INRA, UMR GABI, Jouy-en-Josas) for performing the RNA labelling and microarray processing. We also thank the PEGASE Genetics and Genomics team (INRA, UMR1348, Rennes, France) for developing the 8 x 60K Agilent custom platform.

Finally, we thank the staff of the poultry breeding facilities (PEAT, INRA, 37380, Nouzilly, France) and of the Avian Research Unit (UMR BOA, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France) for their technical assistance.

## **Authors' contributions**

CB and ELBD supervised the study, defined the experimental design and supervised the phenotyping with FF. AB and EP performed the reannotation of the chip based on the current genome Galgal5. EP was in charge of differential analysis with CHA, functional annotation with AB and weighted correlation network analysis. CHA and AJ actively participated in the discussion of the functional analysis and weighted correlation network analysis and supervised EP. EP and EG designed and tested the oligonucleotide primers, extracted RNA and performed quantitative RT-PCR analyses. EP and TB carried out the histological characterization of muscles under the supervision of CP. EP drafted the first version of the manuscript under the supervision of CB and ELBD. All the authors read and approved the final manuscript.

## **Additional information**

### **Ethics approval**

Experimentation was conducted in the INRA PEAT experimental facilities (Nouzilly, France) and authorized for animal experimentation by the French veterinary service, which is the

competent authority (D-37-175-1). The scientist in charge of the experimentation received training and personal authorization (37-112). In agreement with the Ethical Committee for Animal Experimentation in Val de Loire (C2EA-19), the experiments reported here did not require approval from a specific ethical committee since only classical rearing practices for broilers were used. No permissions were required to collect the chicken lines owned by INRA.

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and materials**

The microarray data were submitted to the Gene Expression Omnibus (GEO) microarray database (accession number GSE127806).

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

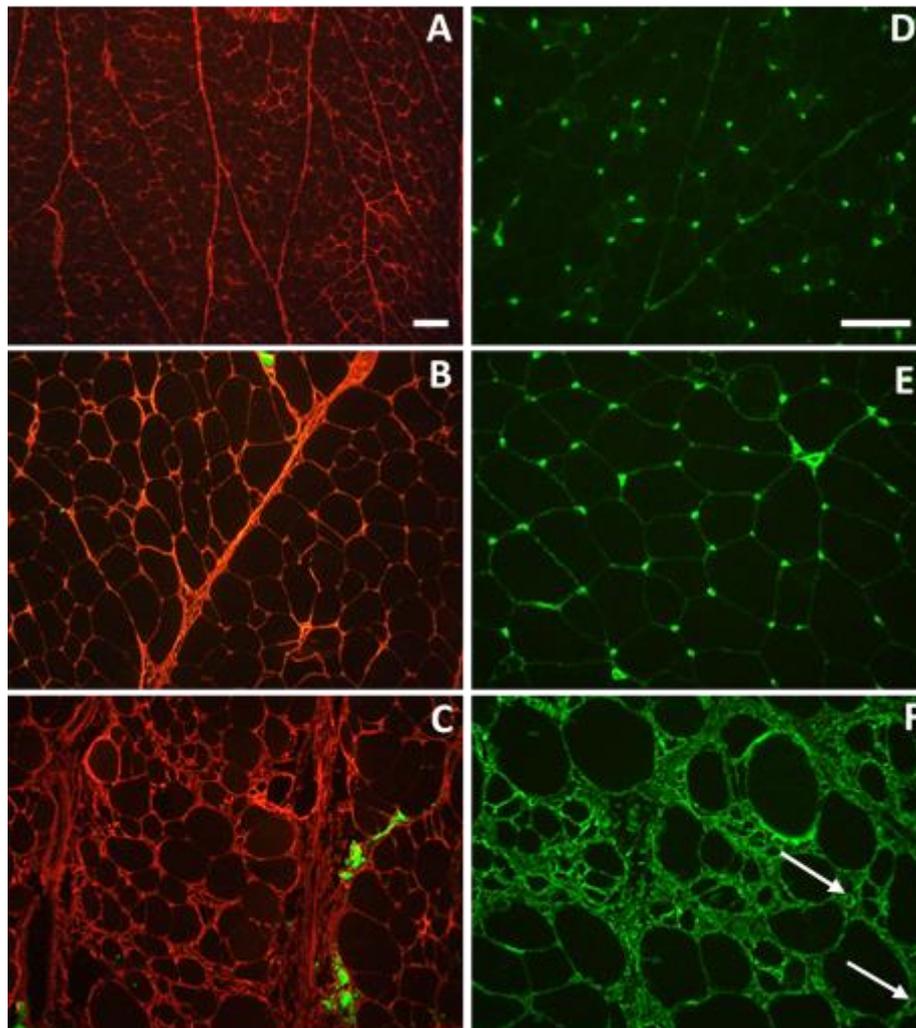
### **Funding**

The phenotyping of the birds used for transcriptomic analysis and microarray processing was performed by the @BRIDGe platform (INRA, UMR GABI, Jouy-en-Josas) and funded by the TECNOVIA program, which is supported by the Bretagne and Pays de la Loire regions (France). This funding body had no role in the design of the study, the collection, analysis, and interpretation of the data or the writing of the manuscript.

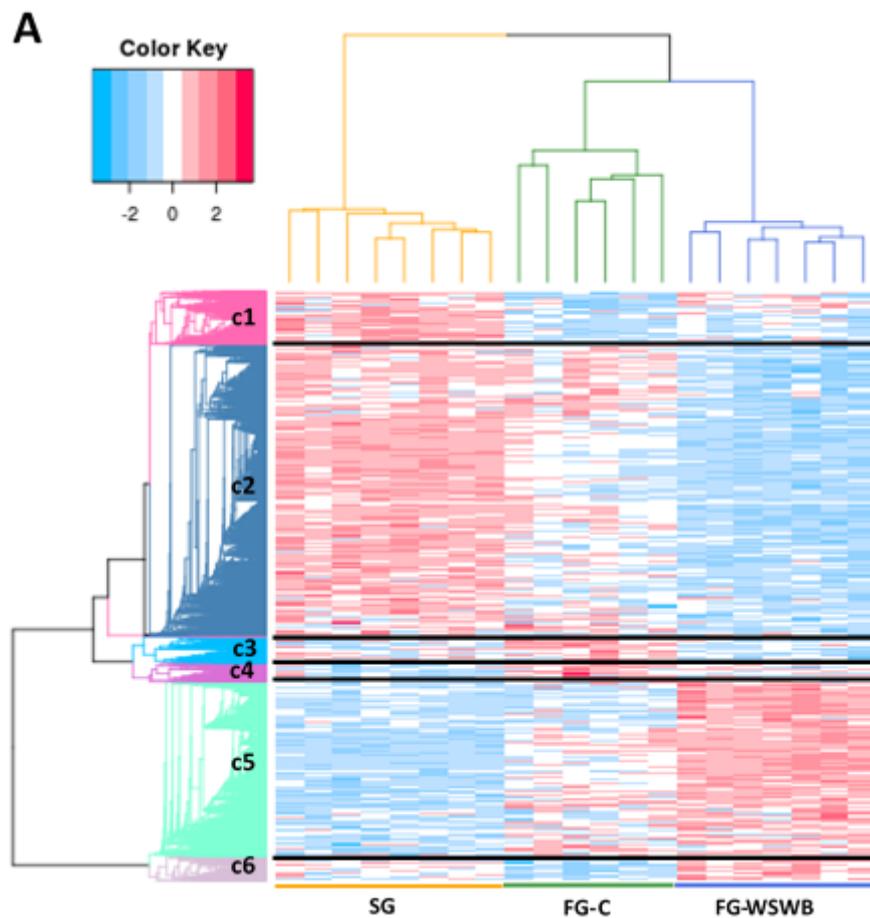
## Figure legends

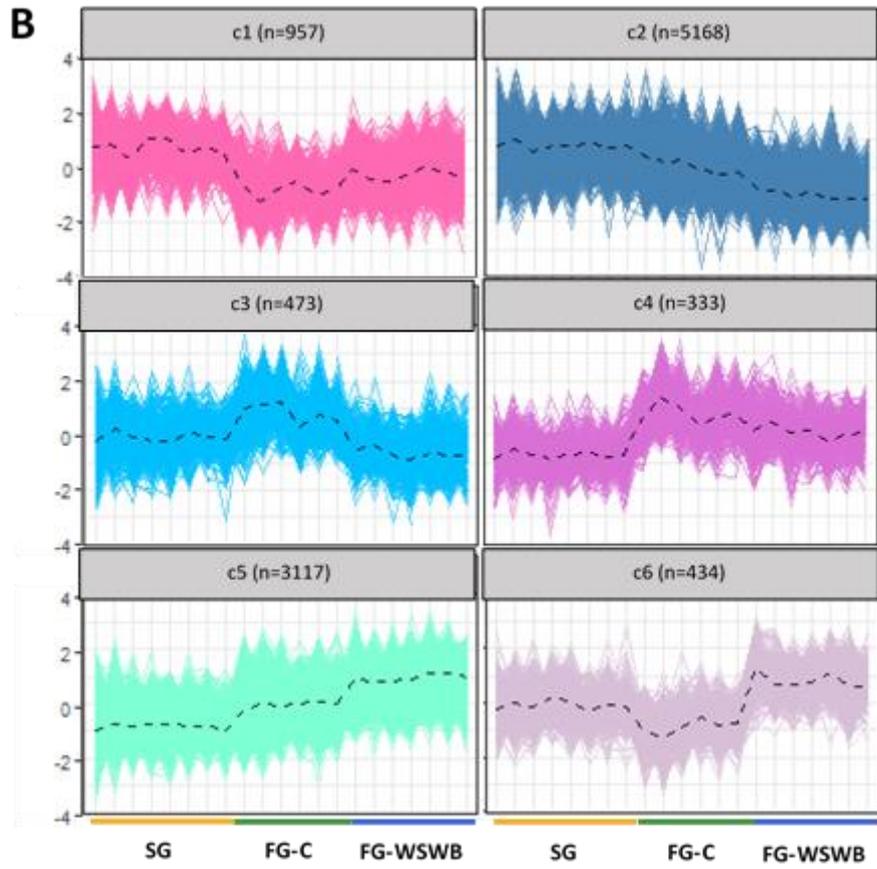
**Figure 1** Collagen VI-Bodipy co-labelling (**A-C**) and fibronectin labelling (**D-F**) fluorescence micrographs of SG (**A and D**), FG-C (**B and E**) and FG-WSWB (**C and F**) *pectoralis major* muscles. Capillaries in the affected muscles (**F**) are indicated by arrows. Scale bar: 100  $\mu$ m.

A, B, and C: 10 $\times$  objective, D, E and F: 20 $\times$  objective.

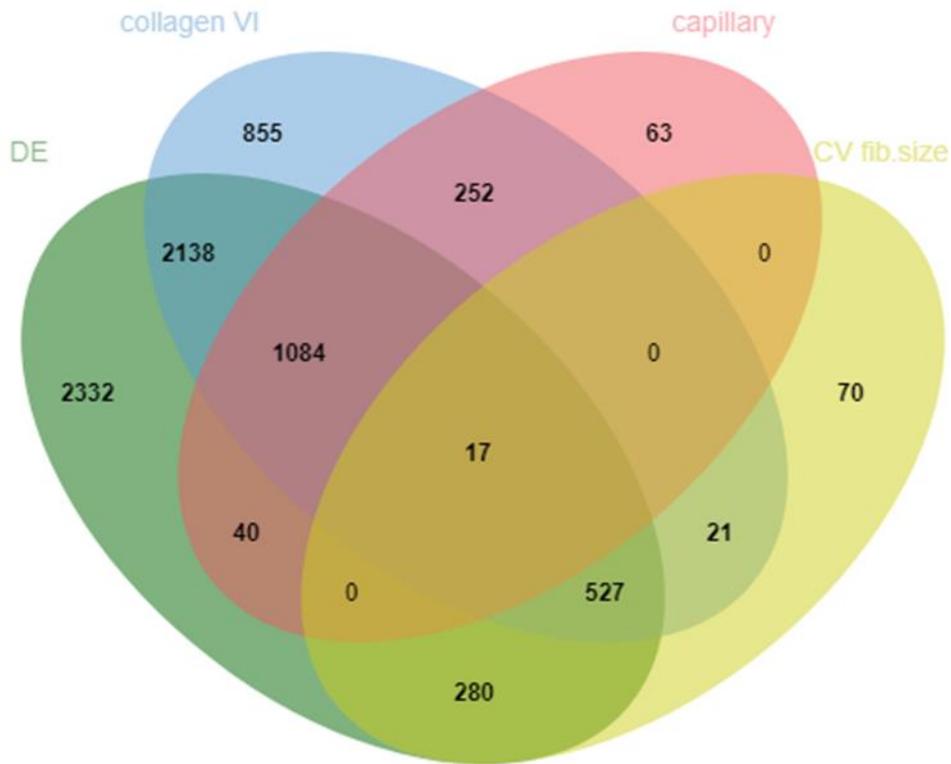


**Figure 2** Heat map gene cluster classification of the SG, FG-C and FG-WSWB samples (**A**). Samples are shown in columns and DE genes in rows, and the scaled expression levels are depicted by a colour gradient: upregulated and downregulated genes are shown in red and blue, respectively. DE genes were grouped by a hierarchical clustering analysis in both rows and columns. Hierarchical clustering for the scaled gene expression matrix was based on the Pearson correlation distance and the average link aggregation distance. A modular height cut-off value in the hierarchical tree allowed the identification of six clusters (c1-c6) of DE genes with similar expression profiles (**B**). The dashed line indicates the average expression profile. The number of DE genes belonging to each cluster is indicated in parenthesis.

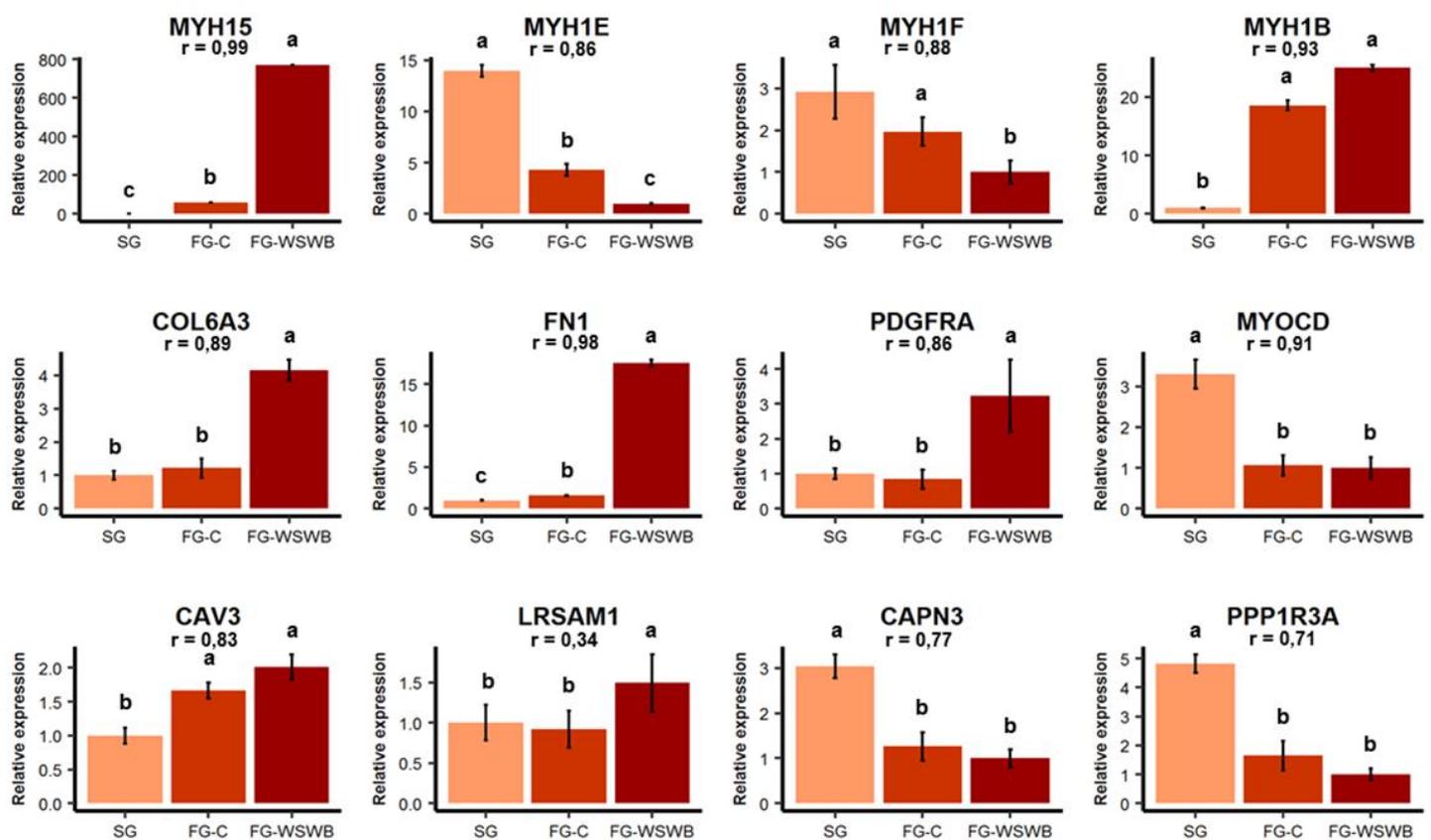




**Figure 3** Venn diagram showing the number of genes that were common between two or more analyses (DE: gene differentially expressed (adjusted p-value < 0.05) between FG-C and FG-WSWB muscles, collagen VI: hub genes for collagen VI labelling, capillary: hub genes for number of capillaries, CV fib. size: hub genes for variation in fibre size).



**Figure 4** Relative expression by RT-qPCR of the 12 genes used for validation. The relative level of gene expression in each group was normalized according to the lowest value, which was arbitrarily defined as 1. Error bars indicate  $\pm$  SE. <sup>a-b-c</sup> Analysis of variance performed with the group factor for each gene. Different superscripts above bars indicate significant differences between groups, as determined by pairwise comparison ( $p$ -values  $\leq 0.05$ ). The  $r$  coefficient indicates the Pearson's correlation between gene expression measured by RT-qPCR and microarray.





## Table legends

**Table 1** Means and standard deviations for histological traits measured in *pectoralis major* muscle cross-sections.

Traits	SG (N=8)	FG-C (N=8)	FG-WSWB (N=8)	p-value
Collagen VI, % *	2.13 ± 0.73 <sup>a</sup>	9.06 ± 2.96 <sup>b</sup>	14.73 ± 4.14 <sup>c</sup>	1.58 × 10 <sup>-7</sup>
Adipose tissue, % *	0.05 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.82 <sup>b</sup>	1.29 × 10 <sup>-3</sup>
Number of fibres per field	203.7 ± 21.2 <sup>a</sup>	51.1 ± 11.4 <sup>b</sup>	45.1 ± 9.5 <sup>b</sup>	2.50 × 10 <sup>-15</sup>
Number of capillaries per field	36.7 ± 8.2 <sup>a</sup>	24.0 ± 7.2 <sup>b</sup>	17.0 ± 5.3 <sup>c</sup>	3.44 × 10 <sup>-4</sup>
Number of fibres per capillary	6.3 ± 2.3 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	2.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	1.20 × 10 <sup>-4</sup>
Fibre surface per capillary, µm <sup>2</sup>	12961 ± 3985 <sup>a</sup>	20169 ± 4248 <sup>b</sup>	22150 ± 5681 <sup>b</sup>	3.89 × 10 <sup>-3</sup>
Fibre size, µm **	25.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	55.2 ± 8.5 <sup>b</sup>	48.2 ± 11.4 <sup>b</sup>	5.22 × 10 <sup>-6</sup>
Coefficient of variation of fibre size, %	25.5 ± 2.0 <sup>a</sup>	37.8 ± 7.9 <sup>a</sup>	50.5 ± 10.7 <sup>b</sup>	3.14 × 10 <sup>-3</sup>

\*Relative area (%) occupied by collagen VI or adipose tissue.

\*\*Calculated from the Feret's minimum diameter.

<sup>a, b, c</sup> Analysis of variance performed with the group factor for each trait. Different superscripts in each line indicate significant differences between groups, as determined by pairwise comparison (p-values ≤ 0.05).

**Table 2** Top 10 DE genes for each comparison based on adjusted p-value.

Gene symbol*	Gene ID	Description	Adjusted p-value	log FC
<b>FG.C vs. SG</b>				
<b>MUSTN1</b>	404773	musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	$9.39 \times 10^{-14}$	5.02
GOLGB1	426868	golgin B1	$1.36 \times 10^{-12}$	-2.80
<b>TNNT2</b>	396433	troponin T2, cardiac type	$1.63 \times 10^{-12}$	4.87
RGCC	418833	regulator of cell cycle	$1.63 \times 10^{-12}$	4.09
PIH1D3	422184	PIH1 domain containing 3	$2.27 \times 10^{-12}$	-2.25
MTPN	395702	myotrophin	$3.82 \times 10^{-12}$	1.83
DUSP5	423890	dual specificity phosphatase 5	$4.12 \times 10^{-12}$	3.84
SPP1	395210	secreted phosphoprotein 1	$4.20 \times 10^{-12}$	6.45
<b>RPS6KA1L</b>	396579	ribosomal protein S6 kinase A1-like	$4.20 \times 10^{-12}$	2.37
RUNX1	396152	runt-related transcription factor 1	$7.43 \times 10^{-12}$	3.22
<b>FG-WSWB vs. SG</b>				
<b>TNNT2</b>	396433	troponin T2, cardiac type	$6.44 \times 10^{-16}$	7.08
TNNT1	396009	troponin T1, slow skeletal type	$2.09 \times 10^{-15}$	5.85
TUBAL3	416694	tubulin alpha like 3	$2.09 \times 10^{-15}$	4.38
KCNK2	770954	potassium two pore domain channel subfamily K member 2	$2.09 \times 10^{-15}$	4.79
<b>RPS6KA1L</b>	396579	ribosomal protein S6 kinase A1-like	$2.09 \times 10^{-15}$	3.35
<b>MUSTN1</b>	404773	musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	$2.09 \times 10^{-15}$	5.18
APTX	395173	aprataxin	$2.09 \times 10^{-15}$	-2.86
MYH15	395534	myosin heavy chain 15	$3.12 \times 10^{-15}$	7.37
<b>MDK</b>	423196	midkine	$4.40 \times 10^{-15}$	5.21
VDAC1	416320	voltage dependent anion channel 1	$4.40 \times 10^{-15}$	-2.76
<b>FG-WSWB vs. FG-C</b>				
AKR1D1	418107	aldo-keto reductase family 1 member D1	$1.91 \times 10^{-11}$	4.08
FBLN1	373979	fibulin 1	$5.16 \times 10^{-11}$	3.85
FN1	396133	fibronectin 1	$6.17 \times 10^{-11}$	2.42
TNFAIP6	424315	TNF alpha induced protein 6	$6.86 \times 10^{-11}$	3.38
<b>MDK</b>	423196	midkine	$7.21 \times 10^{-11}$	3.62
ENPP2	420361	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	$1.72 \times 10^{-10}$	2.93
OLFML3	419882	olfactomedin like 3	$1.72 \times 10^{-10}$	1.98
FKBP10	427013	FK506 binding protein 10	$1.72 \times 10^{-10}$	1.94
CCDC180	772014	coiled-coil domain containing 180	$3.59 \times 10^{-10}$	-1.76
CTHRC1	420262	collagen triple helix repeat containing 1	$5.66 \times 10^{-10}$	4.22

\*Common genes between two or three comparisons are indicated in bold.

**Table 3** Functional enrichment of each cluster of DE genes.

Clusters	Number of DE genes	Number of enriched terms	Main enriched function
<b>Cluster c1</b>	957	24	metabolic process (protein, glycogen, nucleic acid); immune system (lymphocyte, immune effector process); signal transduction (intracellular steroid hormone receptor)
<b>Cluster c2</b>	5168	51	metabolic process (cellular respiration, aerobic respiration, protein, ATP, nucleic acid); gene expression; cellular component organization (vacuole, Golgi, autophagosome); macromolecular complex assembly (mitochondrial respiratory chain complex); actin cytoskeleton organization
<b>Cluster c3</b>	473	8	cellular process (apoptosis, cytokinesis); response to stimulus (oxidative stress, epidermal growth factor); regulation of transcription
<b>Cluster c4</b>	333	18	metabolic process (protein); response to stimulus (adaptive immune response, cellular response to tumour necrosis); signal transduction
<b>Cluster c5</b>	3117	128	metabolic process (protein, lipid, carbohydrate); biosynthetic process (collagen, lipid); organization (actin cytoskeleton, collagen fibril, extracellular matrix); body defence, immune system; cell migration, adhesion, proliferation (skeletal muscle satellite cell, fibroblast), development, morphogenesis (angiogenesis)
<b>Cluster c6</b>	434	38	cell migration, adhesion, proliferation; signal transduction (Wnt, Rho protein signalling pathway); transport (oxygen); actin cytoskeleton organization; metabolic process (protein, proteoglycan); neurogenesis

**Table 4** Set of candidate biomarkers of severe breast muscle myopathies identified based on combinations of genes that were differentially expressed between FG-WSWB and FG-C muscles and the WGCNA analyses as well as QTL mapping for WS.

Gene Symbol	Gene ID	Description
ARNT2	415481	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
EYA2	395745	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 2
PTGS1	427752	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
CADM1	419762	cell adhesion molecule 1
SLIT3	374173	slit guidance ligand 3
PDLIM1	428948	PDZ and LIM domain 1
GPR162	418288	G protein-coupled receptor 162
TBC1D19	422800	TBC1 domain family member 19
COL6A2	396292	collagen type VI alpha 2 chain
HIF1AN	428952	hypoxia inducible factor 1 subunit alpha inhibitor
LRWD1	417511	leucine rich repeats and WD repeat domain containing 1
NAV3	417869	neuron navigator 3
LOC421935	421935	uncharacterized
ADORA1	374212	adenosine A1 receptor
LOC107051073	107051073	uncharacterized
ATP8B1	426857	ATPase phospholipid transporting 8B1
C9H21ORF2	424866	chromosome 9 C21orf2 homolog
<b><i>Located in a QTL region for WS</i></b>		
MYH15	395534	myosin heavy chain 15
COL6A3	396548	collagen type VI alpha 3 chain
FN1	396133	fibronectin 1
MYH1E	427788	myosin heavy chain 1E, skeletal muscle
MYH1F	768566	myosin, heavy chain 1F, skeletal muscle

## Additional files

**Additional file 1** Means and standard deviations for body weight, body composition and meat quality traits measured at 6 weeks of age.

Traits*	FG-C (N=8)	FG-WSWB (N=8)	p-value**
<b>Growth and body composition</b>			
BW (g)	3213 ± 211	3435 ± 284	0.10
PMY (%)	17.06 ± 1.38	18.72 ± 1.14	<b>0.02</b>
PmY (%)	3.96 ± 0.30	3.74 ± 0.36	0.20
BMV(%)	21.0 ± 1.55	22.5 ± 1.41	0.07
AFP (%)	1.61 ± 0.27	1.79 ± 0.34	0.28
<b>Pectoralis major quality traits</b>			
pHu	5.92 ± 0.11	5.91 ± 0.20	0.83
L*	50.1 ± 2.66	53.0 ± 2.95	0.07
a*	-0.93 ± 0.43	-0.92 ± 0.39	0.95
b*	10.2 ± 0.65	11.1 ± 1.35	0.14
DL (%)	2.09 ± 0.84	4.00 ± 0.95	<b>8.07 × 10<sup>-4</sup></b>
CL (%)	13.3 ± 2.95	19.2 ± 2.91	<b>1.26 × 10<sup>-3</sup></b>
CCY (%)	82.6 ± 2.45	78.2 ± 5.59	0.07
SF (N/cm <sup>2</sup> )	12.8 ± 0.94	13.2 ± 1.63	0.56
TBA-RS	0.50 ± 0.16	0.59 ± 0.22	0.37

\*BW body weight, PMY pectoralis major yield, PmY pectoralis minor yield, BMV breast meat yield, AFP abdominal fat percentage, pHu pectoralis major ultimate pH, L\* lightness, a\* redness, b\* yellowness, DL drip loss, CL cooking losses, CCY curing-cooking yield, SF shear force value of the cooked meat, TBA-RS thiobarbituric acid-reactive substance of the raw meat.

\*\*Two-tailed Welch's mean values equality t-test at 95% confidence level

**Additional file 2** Top 10 DE genes for each comparison based on log FC.

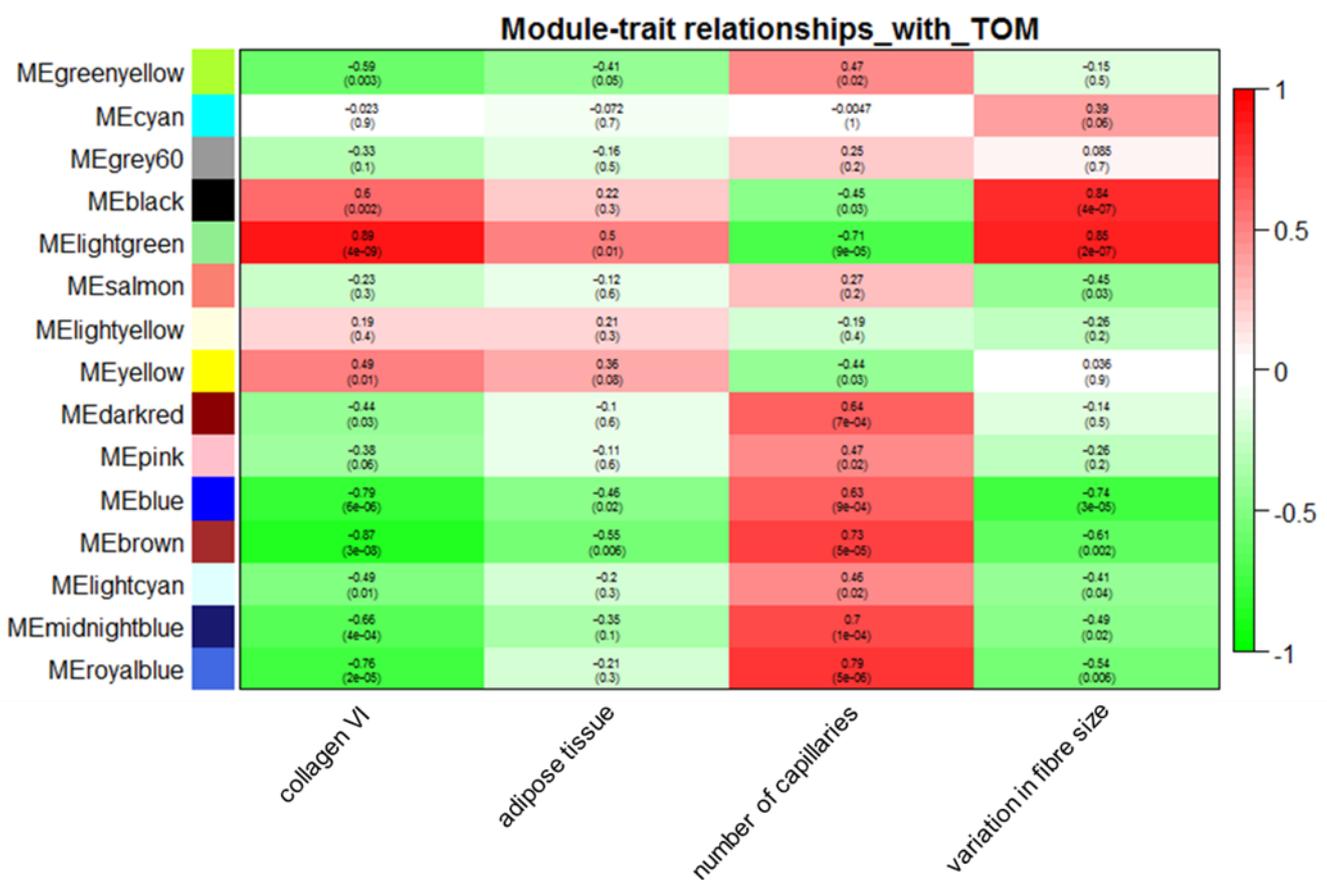
Gene symbol*	Gene ID	Description	log FC	Adjusted p-value
<b>FG.C vs. SG</b>				
<b>SPP1</b>	395210	secreted phosphoprotein 1	6.64	$5.53 \times 10^{-12}$
<b>MYH1B</b>	374069	myosin heavy chain 1B, skeletal muscle (embryonic isoform)	5.97	$2.19 \times 10^{-11}$
<b>CSRP3</b>	422979	cysteine and glycine rich protein 3	5.46	$1.20 \times 10^{-9}$
MYH1A	417309	myosin heavy chain 1A, skeletal muscle	5.20	$5.02 \times 10^{-9}$
<b>TPM3</b>	770103	tropomyosin 3	5.19	$1.66 \times 10^{-10}$
MUSTN1	404773	musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	5.07	$6.83 \times 10^{-13}$
<b>TNNT2</b>	396433	troponin T2, cardiac type	4.93	$3.17 \times 10^{-12}$
<b>MYH15</b>	395534	myosin heavy chain 15	4.91	$4.19 \times 10^{-10}$
LOC769899	769899	avidin-related protein 4/5-like	4.81	$6.04 \times 10^{-7}$
PLN	396378	phospholamban	4.78	$1.61 \times 10^{-10}$
<b>FG-WSWB vs. SG</b>				
<b>MYH15</b>	395534	myosin heavy chain 15	7.88	$1.33 \times 10^{-14}$
<b>SPP1</b>	395210	secreted phosphoprotein 1	7.86	$1.84 \times 10^{-14}$
<b>TPM3</b>	770103	tropomyosin 3	7.55	$1.88 \times 10^{-14}$
<b>CSRP3</b>	422979	cysteine and glycine rich protein 3	7.36	$6.54 \times 10^{-13}$
<b>PTX3</b>	548626	pentraxin 3	7.24	$2.24 \times 10^{-14}$
TNNI1	421161	troponin I type 1 (skeletal, slow)	7.18	$4.49 \times 10^{-15}$
<b>TNNT2</b>	396433	troponin T2, cardiac type	7.17	$7.64 \times 10^{-16}$
OCM2	396531	oncomodulin 2	7.13	$1.55 \times 10^{-12}$
<b>MYH1B</b>	374069	myosin heavy chain 1B, skeletal muscle (embryonic isoform)	7.12	$1.71 \times 10^{-13}$
MYOZ2	422682	myozenin 2	6.75	$3.21 \times 10^{-14}$
<b>FG-WSWB vs. FG-C</b>				
CTHRC1	420262	collagen triple helix repeat containing 1	4.22	$5.66 \times 10^{-10}$
AKR1D1	418107	aldo-keto reductase family 1 member D1	4.08	$1.91 \times 10^{-11}$
TNFAIP6	424315	TNF alpha induced protein 6	3.92	$1.72 \times 10^{-10}$
FBLN1	373979	fibulin 1	3.85	$5.16 \times 10^{-11}$
MDK	423196	midkine	3.84	$6.18 \times 10^{-10}$
THBS2	414837	thrombospondin 2	3.77	$6.30 \times 10^{-10}$
PTN	418125	pleiotrophin	3.53	$1.18 \times 10^{-6}$
<b>PTX3</b>	548626	pentraxin 3	3.53	$1.90 \times 10^{-8}$
FRMD5	396204	nephroblastoma overexpressed	-3.46	$2.75 \times 10^{-9}$
<b>MYH15</b>	395534	myosin heavy chain 15	3.28	$1.60 \times 10^{-8}$

\*Common genes between two or three comparisons are indicated in bold.

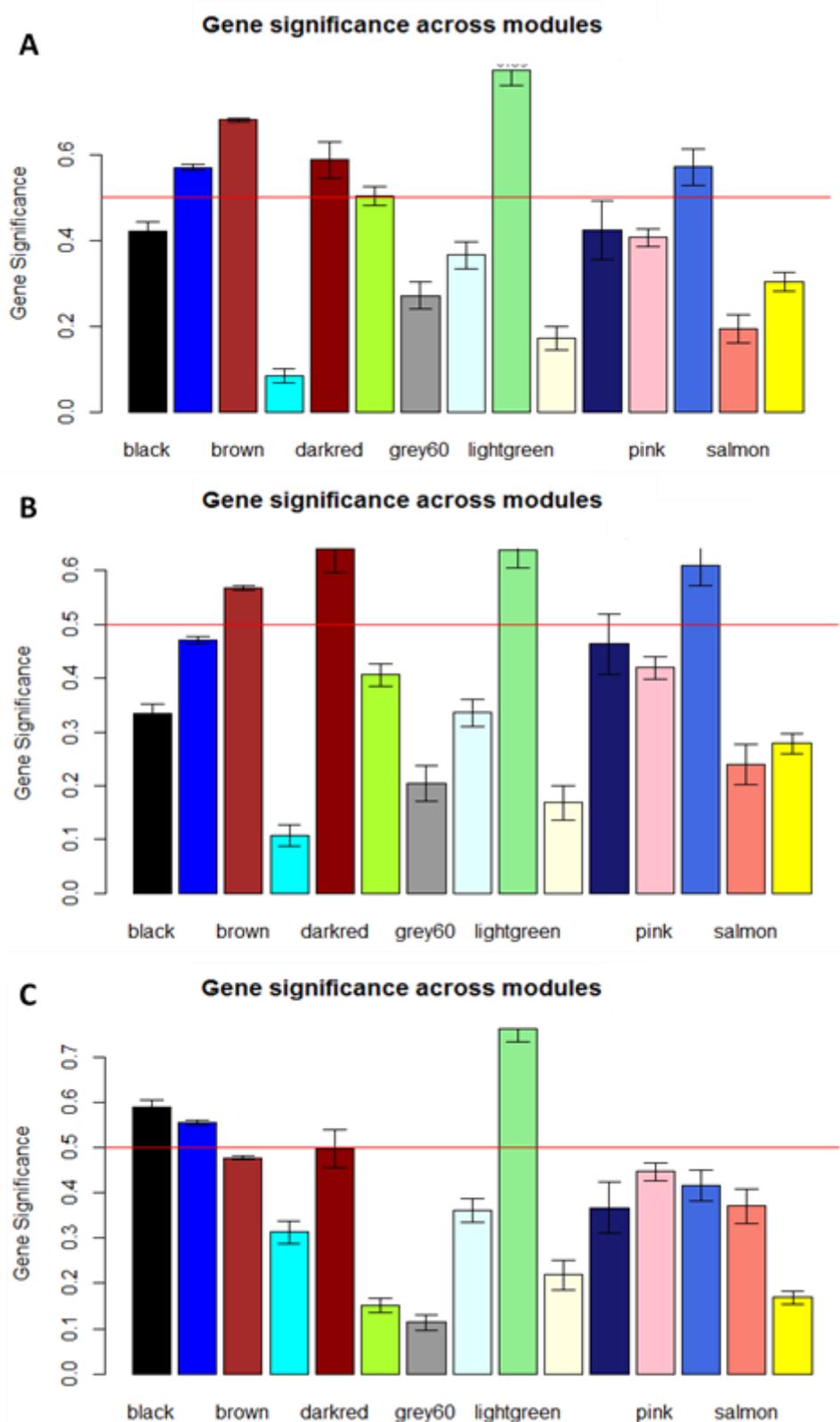
**Additional file 3** Functional enrichment analysis of each cluster of DE genes that shared a similar expression profile (see Excel file Additional\_file\_3.xlsx).

**Additional file 4** Relationships between gene expression modules and histological traits.

Each row corresponds to a module eigengene, and each column corresponds to one histological trait. Each cell contains the corresponding correlation and its associated p-value (shown in brackets). The table is colour-coded by correlation according to the colour legend.



**Additional file 5** Mean gene significance across modules for collagen (A), the number of capillaries (B) and the coefficient of variation for fibre size (C).





**Additional file 6** Probe annotation based on the Galgal5 assembly (see Excel file

Additional\_file\_6.xlsx).

**Additional file 7** Primer sequences and gene ID of the subset of genes used for RT-qPCR validation.

<b>Gene</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
CAPN3	423233	CAAACCCAGTGCTCATTCCCT	GCCTGACCCACACTGATTTT
CAV3	378796	GAAAGGCAGCTACACCACCT	GTAGATGCGGCTGACACACT
COL6A3	396548	AGCCCAAAGTGACCTACACG	GCAGATGTCCATGACATTTTCAG
FN1	396133	CACAAACACCAACGTCAACT	GTTTGGATGGTAATCGTGGCAG
LRSAM1	417265	AGGTCCTCAATGTGAAAGGCA	TTGCAGAGGAACTGCTGAATG
MYH15	395534	TTCAAGCAAACCCAGCCCTA	GATTTTTCAGCAACCGGGTG
MYH1B	374069	AGGAGCTGTCCAATGTCAACCTC	GCAGAAGAAAGCAACAGAGGGTTC
MYH1E	427788	CCAAATTCCGCAAGATCCAAC	CTTATGCCACTTTGTTGTCACGAC
MYH1F	768566	AGCTGTCCAATGTCAACCTTTCC	TGCCTCAGGTCACACTTTAGC
MYOCD	427790	GTCTGAGCACTCCTTGCTGATT	CGTTGTTCATGGAATGCGG
PDGFR $\alpha$	395509	GAGTCACAAAAGCCGTGGACAT	TGTTTTCTCACAGGACCGCTC
PPP1R3A	101747406	GGCAAACAACGACGACAAAAAC	TTCTTCCTTGCTGCTTGGTGC

# DISCUSSION GENERALE

---

La filière avicole repose en grande partie sur la production de poulets à croissance rapide, abattus à des poids élevés et destinés aux filières de découpe et de transformation. Depuis près de 10 ans, celle-ci est confrontée à des défauts d'intégrité musculaires s'apparentant à des myopathies, tels que le white striping et le wooden breast, observés essentiellement sur le filet des poulets de chair. Les conséquences de ces défauts sur la qualité de la viande sont multiples : dégradation de l'aspect du produit, modification de la valeur nutritionnelle de la viande, et mauvaise capacité de rétention d'eau qui s'exprime par des pertes à la cuisson plus élevées et des rendements technologiques plus faibles que ceux des filets normaux. Les viandes présentant ces défauts ne peuvent pas être vendues en frais et sont transformées en produits élaborés, voire déclassées dans les cas les plus sévères. Ces défauts sont donc à l'origine de pertes économiques importantes et d'une dégradation de l'image de la filière viande de volailles. Même si ces défauts sont aujourd'hui largement présents en abattoirs et que des études antérieures aient démontré un lien défavorable avec la croissance et le rendement en filet des poulets, leur étiologie reste mal comprise.

Sur le plan scientifique, il est important de bien comprendre les causes et les mécanismes sous-jacents pour rechercher des solutions génétiques, nutritionnelles et d'élevage permettant d'atténuer voire d'éliminer ces myopathies sur le terrain. Les recherches menées à ce jour ont amélioré notre connaissance des processus biologiques impliqués dans l'apparition des défauts musculaires de la viande, mais pour l'instant, aucune solution n'a été trouvée pour réduire de manière significative leur incidence sans affecter les performances des animaux. Nous pouvons néanmoins supposer qu'une partie de la solution passera par l'amélioration génétique des souches en complément de solutions nutritionnelles et de l'amélioration des pratiques d'élevage. La mise en œuvre de ces solutions sera facilitée par la mise au point d'outils de diagnostic basés sur des indicateurs et des biomarqueurs permettant un phénotypage fin des défauts. L'étude de l'architecture génétique des défauts contribuera également à l'identification de marqueurs génétiques et de gènes candidats utiles au développement de la sélection génomique.

Dans ce contexte, les profils protéomiques et transcriptomiques de muscles atteints ou non par les défauts WS et WB ont été étudiés. L'analyse transcriptomique a fait l'objet d'une analyse et d'une discussion dans un article présenté précédemment. Grâce à la comparaison d'animaux à croissance lente ou à croissance rapide, atteints ou non de myopathies, nous avons cherché à dissocier les voies moléculaires altérées par la sélection à long terme sur les performances de croissance des animaux de celles spécifiquement activées en cas de myopathies sévères. En

s'appuyant sur l'ensemble de ces résultats, nous avons élaboré un schéma sur les mécanismes sous-jacents au développement des défauts WS et WB. L'intégration des analyses protéomiques permet d'avoir une vision plus globale. Elle sera développée dans la première partie de la discussion consacrée à l'apport de la thèse pour la connaissance de l'étiologie des défauts.

Dans la seconde partie de la discussion nous rappellerons les principaux résultats acquis sur le contrôle génétique du défaut WS et présenterons quelques résultats complémentaires de validation de marqueurs génétiques.

Enfin, la dernière partie de la discussion sera dédiée à l'intégration des différentes approches omiques et histologiques menées au cours de cette thèse qui ont mené à l'identification de nouveaux indicateurs et biomarqueurs de la sensibilité aux défauts. Nous aborderons notamment les opportunités de développement d'outils quantitatifs fins pouvant affiner le diagnostic des myopathies WS et WB.

## **I. Compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des myopathies WS et WB en lien avec la sélection**

### **I.1 Impact de la sélection à long terme sur la croissance et le rendement en filet**

L'effet à long terme de la sélection génétique et de l'intensification des méthodes de production a conduit à d'énormes progrès en termes de croissance et de développement musculaire des poulets de chair. Il a clairement été démontré que la fréquence et la gravité des défauts augmentaient avec la croissance et le rendement en filet des animaux (Kuttappan *et al.*, 2013a ; Lorenzi *et al.*, 2014 ; Russo *et al.*, 2015 ; Kuttappan *et al.*, 2017b). La comparaison des muscles issus de poulets à croissance lente (CL) avec des muscles issus de poulets à croissance rapide affectés (CR-WSWB) ou non (CR-C) par des défauts WS et WB nous a permis de spécifier les changements structuraux et métaboliques résultant d'une telle sélection, et qui ont pu conduire au développement de ces myopathies.

**Vascularisation.** Les analyses histologiques et transcriptomiques menées au cours de cette thèse ont clairement démontré un **déficit de vascularisation** dans les muscles issus de la souche à croissance rapide qui conduisent à la mise en œuvre de mécanismes de réponse à l'hypoxie. L'analyse histologique a montré que, par rapport aux muscles CL, les muscles CR présentaient

une diminution du nombre de capillaires par unité de surface du muscle ainsi qu'une forte augmentation de la surface des fibres alimentées par un capillaire. Les mêmes observations ont été faites dans les muscles uniquement atteints de WB (Sihvo *et al.*, 2018). L'analyse transcriptomique a montré quant à elle une sous expression dans les muscles CR par rapport aux muscles CL du gène *MYOCD*, qui est à la fois impliqué dans les processus d'angiogenèse et localisé dans une région QTL associée au défaut WS. Ces observations corroborent des études précédentes qui avaient montré que les muscles issus de souches à croissance rapide se caractérisent par une teneur en myoglobine plus faible, une distance inter capillaires plus grande ainsi qu'une réduction de la densité capillaire et du ratio capillaire sur fibre (Hoving-Bolink *et al.*, 2000 ; Berri *et al.*, 2001). Ceci serait lié aux pratiques de sélection visant à améliorer la croissance et le développement musculaire et qui ont profondément modifié l'architecture du muscle, notamment par l'hypertrophie des fibres (augmentation du diamètre et de la longueur de la fibre musculaire) (Hoving-Bolink *et al.*, 2000). Le défaut de vascularisation entraînerait un apport insuffisant en oxygène et en nutriments au sein des fibres musculaires, ainsi qu'une accumulation de déchets métaboliques tel que l'acide lactique. Cette condition pourrait être exacerbée par la physiologie du muscle P. major : son développement impressionnant (notamment en termes d'épaisseur) pourrait comprimer l'artère pectorale, réduisant ainsi davantage l'oxygénation et le transport des nutriments vers le muscle. Cette hypothèse est en outre corroborée par le fait que la sévérité des lésions histologiques, associées à la survenue des défauts WS et WB, diminue progressivement en allant de la surface faisant face à la peau à la section interne du P. major (Clark and Velleman, 2016 ; Soglia *et al.*, 2016b ; Baldi *et al.*, 2018). Nous avons également noté lors de l'analyse histologique une modification de la morphologie et de la localisation des capillaires au sein des muscles CR. En effet, nous avons observé la présence de lumière à l'intérieur des capillaires, probablement suite à une vasodilatation, et l'extension du tissu conjonctif qui altère la connexion entre les capillaires ou les vaisseaux et les fibres musculaires. Cela pourrait limiter encore davantage l'apport en oxygène et en nutriments au sein des fibres musculaires, et exacerber l'accumulation de déchets métaboliques dans ces muscles.

**Glycogène.** L'analyse transcriptomique montre que dans les muscles à croissance rapide, il y a une diminution conséquente de l'expression des gènes qui codent les enzymes impliquées dans le métabolisme glycolytique. Cette constatation est à mettre en parallèle d'études précédentes qui ont démontré un épuisement des réserves en glycogène consécutif à la sélection sur la croissance et le rendement en filet (Berri *et al.*, 2001 ; Berri *et al.*, 2007). Une hypothèse est

que la diminution de la vascularisation observée dans les muscles de poulets à croissance rapide et qui entraîne un apport insuffisant d'oxygène et de nutriments aux fibres musculaires, a pu favoriser **une utilisation excessive de glucose et une réduction des réserves en glycogène** dans ces muscles quasiment jusqu'à épuisement. Cette **diminution des réserves en glycogène** pourrait conduire à un environnement métabolique prédisposant au développement de syndromes myopathiques dans ces muscles. En effet, de tels changements ont pu conduire les cellules à utiliser **d'autres voies cataboliques** pour produire de l'énergie. Ainsi, il a été récemment démontré chez le poulet que les muscles dépourvus de glycogène (en l'occurrence les poulets de la lignée pHu+) utilisaient l'énergie produite par le catabolisme des acides aminés et l'oxydation des lipides, conduisant à une réponse adaptative au stress oxydatif (Beauclercq *et al.*, 2016 ; Beauclercq *et al.*, 2017). De plus, comme il a déjà été précisé dans l'étude bibliographique, de nombreuses études ont montré que l'apparition des défauts WS et surtout WB était associée à un pHu élevé de la viande (Petracci *et al.*, 2013 ; Mudalal *et al.*, 2015 ; Trocino *et al.*, 2015 ; Alnahhas *et al.*, 2016 ; Dalle Zotte *et al.*, 2017) reflétant une faible teneur en glycogène musculaire (Mutryn *et al.*, 2015 ; Abasht *et al.*, 2016). En accord avec ces résultats, des résultats précédents ont effectivement montré que l'incidence et la sévérité du défaut WS étaient plus élevées dans la lignée de poulets de chair sélectionnée pour une valeur de pHu élevée (pHu+), et donc avec de faibles réserves en glycogène, que dans la lignée sélectionnée pour une valeur de pHu faible (pHu-) (Alnahhas *et al.*, 2016). D'ailleurs, nous avons identifié plusieurs QTL associés au caractère WS dans la lignée pHu+ mais pas dans la lignée pHu- (Pampouille *et al.*, 2018), 2018), renforçant l'hypothèse d'une possible interaction entre le contrôle génétique des défauts musculaires et le statut énergétique du muscle.

**Hypoxie et stress oxydatif.** Un défaut de vascularisation dans les muscles entraîne un apport insuffisant en oxygène et en nutriments au sein des fibres musculaires, ainsi qu'une **accumulation de déchets métaboliques**, favorisant ainsi une **condition hypoxique et un stress oxydatif**. Plusieurs études suggèrent que ces conditions ont favorisé ou sont à l'origine du développement des défauts WS et WB (Kuttappan *et al.*, 2012b ; Kuttappan *et al.*, 2013c ; Mutryn *et al.*, 2015 ; Petracci *et al.*, 2015 ; Sihvo *et al.*, 2018). L'analyse transcriptomique révèle une diminution progressive de l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques de la respiration cellulaire (CL > CR-C > CR-WSWB) ainsi qu'une augmentation de la synthèse de transporteurs d'oxygène dans les muscles CR-WSWB, ce qui peut être le signe d'un apport insuffisant en oxygène dans les muscles à croissance rapide, le phénomène étant exacerbé dans les muscles sévèrement atteints. De plus, il ressort des analyses

protéomiques une surabondance de protéines liées à la réponse à un stimulus (stress oxydatif, ROS, stress et inflammation) dans les muscles des animaux sévèrement atteints par les défauts WS et WB. Ces mêmes animaux sur-expriment par ailleurs plusieurs gènes intervenant dans la réponse au stress oxydatif, dont deux qui codent pour des heat-shock protéines identifiées dans l'analyse protéomique (*HSPB1* et *HSPA5*). Ces résultats sont en accord avec Mutryn *et al.* (2015) et Zambonelli *et al.* (2016) qui ont identifié un set de gènes DE, impliqués dans la réaction des fibres musculaires au stress oxydatif dans des échantillons de muscles de poulets à fort rendement en filet atteints par les défauts WS et/ou WB. Le stress oxydatif induit dans ces muscles ainsi que l'accumulation excessive de ROS pourrait être impliqué dans l'initiation des mécanismes inflammatoires et les modifications moléculaires généralement associées aux défauts musculaires WS et WB.

Tout porte à croire que la sélection d'animaux de plus en plus efficaces et performants, dont les fibres musculaires présentent des surfaces deux fois supérieures aux surfaces observées il y a quelques années, a contribué à l'apparition de différentes anomalies structurales et métaboliques dans le muscle qui ont pu conduire progressivement à la création d'un environnement favorable au développement des défauts WS et WB.

## **I.2 Modifications structurales et moléculaires en lien avec l'établissement des myopathies**

Précédemment, nous avons vu que les changements métaboliques et structuraux induits par la sélection à long terme sur les performances de croissance et le développement musculaire ont probablement créé un contexte physiologique favorable à l'apparition des défauts WS et WB en compromettant l'approvisionnement en nutriments et en oxygène au tissu musculaire et l'évacuation des déchets métaboliques, à même d'entraîner des conditions hypoxiques et un stress oxydant au sein du muscle pectoral. Ces conditions permettent d'expliquer les nombreuses modifications biologiques révélées par l'analyse transcriptomique et qui ont par ailleurs été largement décrites dans les muscles atteints des défauts WS et/ou WB (i.e., altération de l'homéostasie du calcium, inflammation, dégénérescence des fibres et régénération, remodelage de la MEC, altération du métabolisme du glucose, etc.).

**Homéostasie du calcium et nécrose des fibres.** L'analyse transcriptomique a révélé une **altération de l'homéostasie du calcium** dans les muscles sévèrement atteints. En condition hypoxique, le transfert des ions calcium du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique diminue, et donc entraîne leur accumulation dans l'espace intracellulaire (Sihvo *et al.*, 2018),

comme cela a été déjà observé au niveau sérique dans les muscles affectés par les défauts WS ou WB (Tasoniero *et al.*, 2016a ; Zambonelli *et al.*, 2016). De plus, une production excessive de ROS suite à un stress oxydant peut également altérer l'homéostasie calcique en provoquant la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (Mutryn *et al.*, 2015 ; Zambonelli *et al.*, 2016 ; Boerboom *et al.*, 2018). L'excès de calcium dans le muscle peut initier plusieurs modifications tissulaires, notamment **l'activation de protéases ou de lipases intracellulaires** qui peuvent entraîner l'altération de l'intégrité de la membrane des fibres et la dégradation des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires conduisant à la **nécrose des fibres** (Petracci *et al.*, 2015), mais aussi **l'augmentation de l'afflux de calcium**. Un "cercle vicieux" de lésions musculaires et de libération de calcium est alors amorcé.

**Réponse inflammatoire et régénération des fibres.** La **réponse inflammatoire** lors de la dégénérescence des fibres, exacerbée par le stress oxydatif, attire les neutrophiles, les macrophages activés et les lymphocytes T dans la région lésée, ce qui conduit à une phagocytose des débris cellulaires et à la libération de facteurs tels que les cytokines, les prostaglandines, etc. Plusieurs gènes impliqués dans la production de molécules inflammatoires et la réponse à l'inflammation sont surexprimés dans les muscles sévèrement atteints par les défauts. Nous avons également observé dans ces muscles de nombreux foyers inflammatoires lors de l'analyse histologique, indiquant une réponse inflammatoire forte. Des réactions biologiques complexes et des processus de régénération visant à atténuer l'inflammation et à limiter l'apoptose cellulaire et la nécrose des tissus ont alors lieu (Petracci *et al.*, 2017). En effet, les facteurs libérés par les cellules inflammatoires tels que TNF- $\alpha$  ou IL-6, qui sont surexprimés dans les muscles CR-WSWB, peuvent **activer les cellules satellites**, principaux contributeurs à la régénération musculaire qui restent au repos dans des conditions normales, et ainsi amorcer la **régénération des fibres musculaires** endommagées. En effet, le TNF- $\alpha$  attire les cellules satellites musculaires sur le site endommagé, favorise leur prolifération en activant la signalisation NF- $\kappa$ B et stimule la différenciation en activant la voie de signalisation p38. L'IL-6 stimule la migration, la prolifération et la différenciation des myoblastes (Yang and Hu, 2018).

**Fibrose - Adipose.** L'analyse histologique révèle plusieurs phénomènes de régénération (splitting ou régénération segmentaire) dans les muscles atteints par les défauts WS et WB. De plus, de nombreux gènes impliqués dans le développement musculaire, la différenciation cellulaire et la prolifération des cellules satellites sont surexprimés dans ces muscles. Toutefois, nous observons également des phénomènes de **fibrose** et d'**adipose**. La myodégénérescence

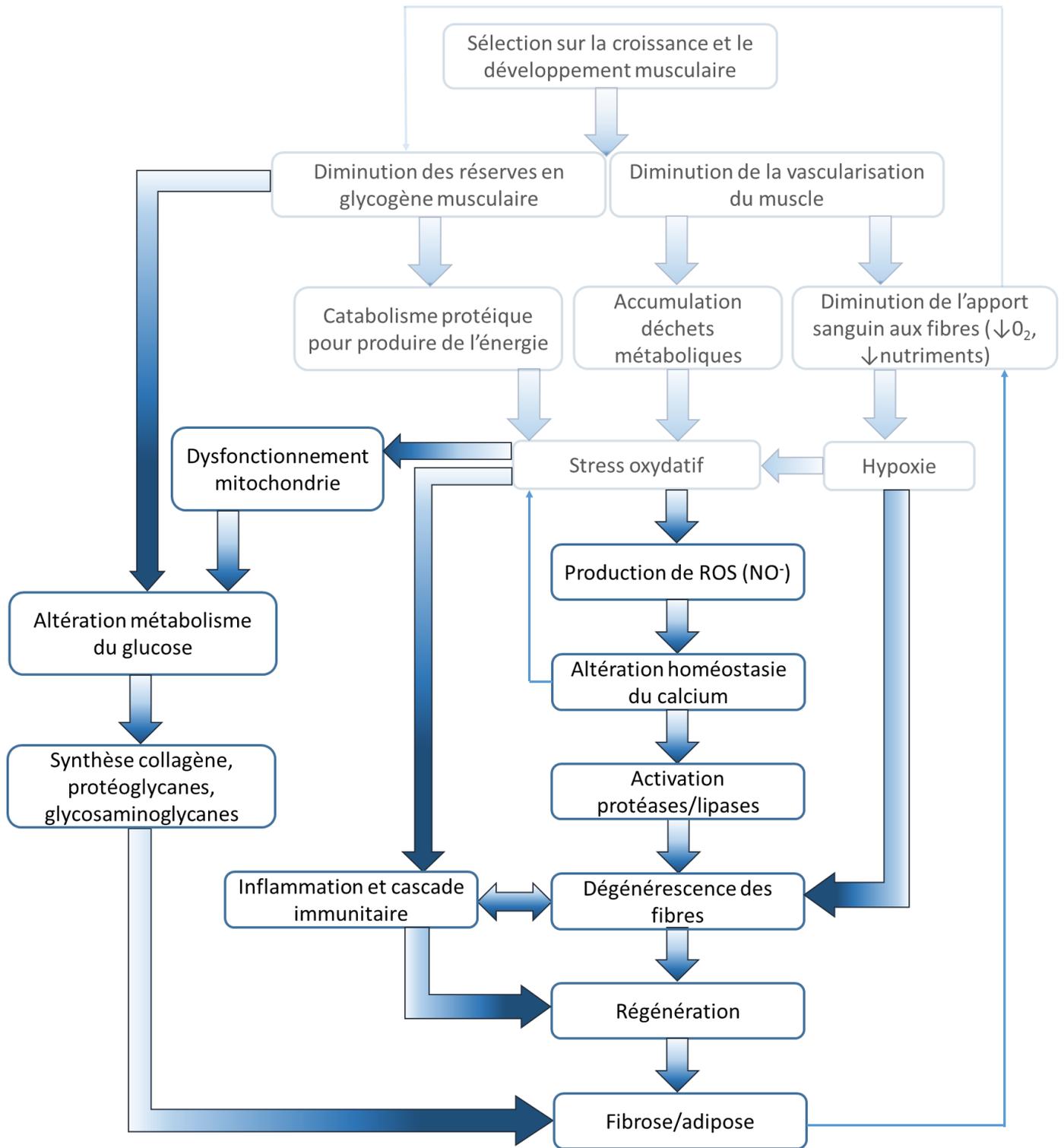


induite a donc pu dépasser la capacité de régénération du muscle, entraînant le remplacement des fibres nécrosées par des inclusions conjonctives et adipeuses. D'ailleurs, une étude a récemment montré que les processus de régénération pour réparer les fibres nécrotiques par les cellules satellites ne restaurent pas complètement la structure du sarcomère dans les muscles affectés par le défaut WB (Velleman *et al.*, 2018). L'altération de l'homéostasie des cellules satellites a également pu contribuer au développement des myopathies du filet. En effet, le nombre de cellules satellites ainsi que leur capacité à proliférer et se différencier diminuent avec l'âge et l'augmentation de la taille du filet (Daughtry *et al.*, 2017). La sélection intensive sur la croissance du filet a donc pu épuiser le pool de cellules satellites des animaux lorsqu'ils atteignent un certain poids et diminuer leur capacité de régénération. Dans ce cas, les cellules souches pluripotentes du tissu musculaire se différencient en fibroblastes ou en adipocytes (Asakura *et al.*, 2001 ; Brack *et al.*, 2007), ce qui aboutit finalement à une **fibrose** et à une **adipose** dans les tissus.

**Métabolisme des glucides.** L'**altération du métabolisme du glucose** a également pu participer à la mise en place des phénomènes de **fibrose** et d'**adipose**. L'analyse fonctionnelle a en effet indiqué une diminution de l'expression des gènes codant pour les enzymes glycolytiques dans les muscles CR-WSWB, en accord avec l'analyse protéomique qui révèle que la majorité des protéines sous-exprimées dans ces muscles sont impliquées dans le métabolisme du glucose (glycolyse, gluconéogénèse et synthèse du glycogène). Ces observations suggèrent une diminution de l'activité glycolytique anaérobie, qui a déjà été observée dans les muscles affectés par les défauts WS et WB (Mudalal *et al.*, 2014 ; Mutryn *et al.*, 2015 ; Abasht *et al.*, 2016 ; Kuttappan *et al.*, 2017a). Cette diminution de l'activité glycolytique anaérobie est concomitante avec l'altération de la respiration cellulaire mitochondriale précédemment observée. De plus, plusieurs gènes surexprimés dans les muscles CR-WSWB sont impliqués dans le transport des dérivés glucidiques, la biosynthèse de sucres nucléotidiques, la voie des pentoses phosphates et la glycogénolyse. Tous ces résultats indiquent clairement une réorientation des voies de production et d'utilisation des glucides à des fins énergétiques et que ces modifications métaboliques sont encore plus prononcées dans les muscles sévèrement atteints par les défauts WS et WB. L'analyse fonctionnelles de ces muscles montre également un enrichissement des fonctions liées à la **synthèse de glycosaminoglycanes** et de **protéoglycanes**, qui sont, avec le collagène, les principaux constituants de la MEC et du tissu fibreux. Ceci renforce l'hypothèse d'une réorientation des réserves glucidiques du muscle vers la production de sucres nucléotidiques (qui permettent la

synthèse de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes) au détriment de la glycolyse et de la synthèse du glycogène dans les muscles affectés. Ceci permettrait de combattre le stress oxydatif induit dans ces muscles et faciliter la régénération musculaire qui entraînerait un développement excessif de la MEC conduisant à la **fibrose**. Cette réorientation métabolique peut être liée à la **diminution progressive de la disponibilité en glucides** (en particulier en glycogène) qui a accompagné la sélection pour la croissance et le rendement en filet mais aussi l'apparition des défauts.

La **Figure 20** propose une représentation synthétique des différents mécanismes sous-jacents à l'établissement des défauts WS et WB dans les souches à croissance rapide.

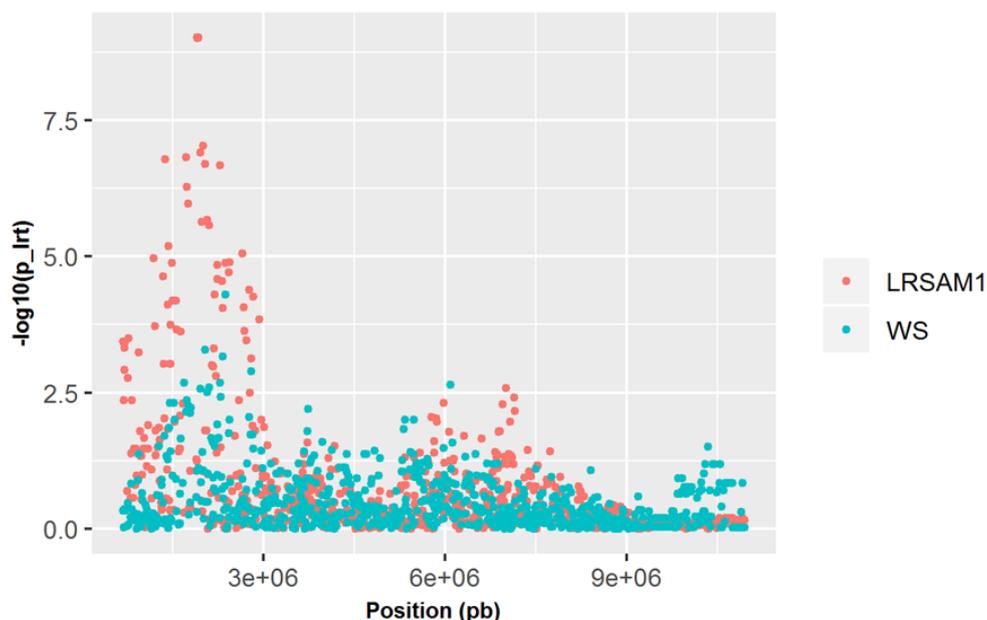


**Figure 20** : Mécanismes sous-jacents conduisant à l'établissement des défauts WS et WB dans les souches à croissance rapide. Les encadrés en bleu clair indiquent les processus biologiques induits par la sélection à long terme sur la croissance et le rendement en filet qui ont pu conduire à l'établissement des myopathies, et en bleu foncé les dérégulations biologiques qui en découlent.

## II. Contrôle génétique du défaut WS

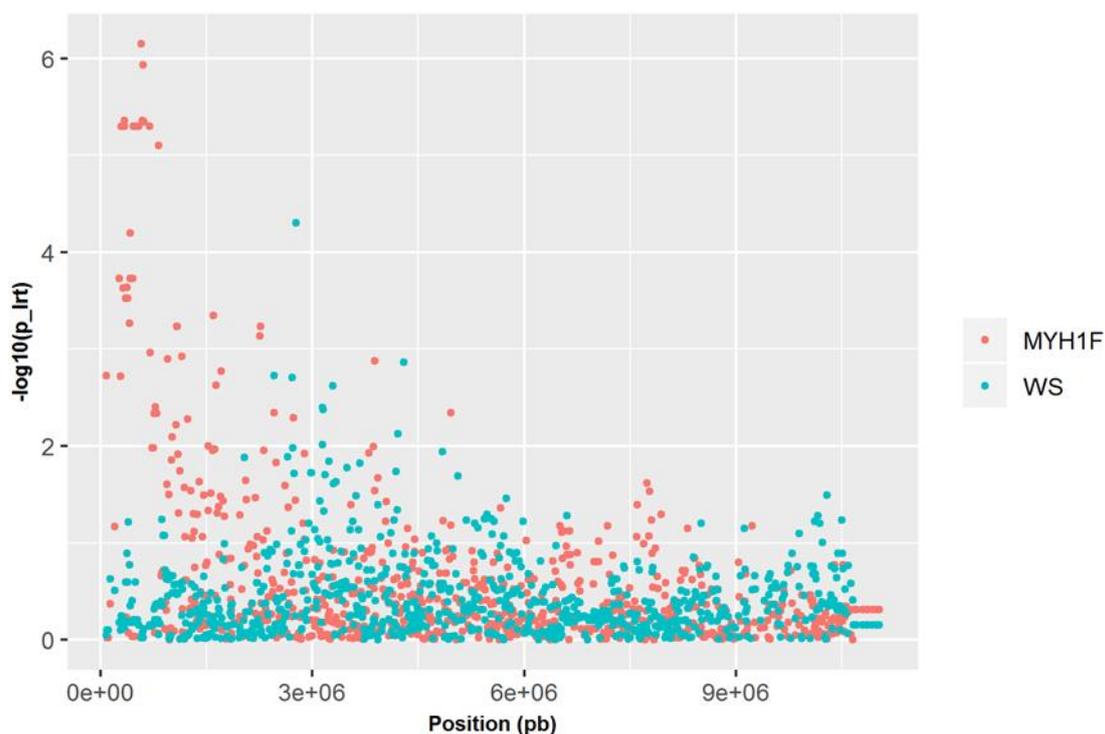
L'analyse GWAS a apporté des résultats originaux sur l'architecture génétique du défaut WS chez le poulet en identifiant pour la première fois des régions QTL. Ces résultats vont dans le sens d'un déterminisme complexe du défaut WS avec plusieurs QTL significatifs agissant sur la variabilité du caractère en plus des nombreux autres gènes à effet faible modélisés au travers de l'effet polygénique. Le déterminisme semble d'autant plus complexe que la détection de QTL de WS réalisée intra-lignée suggère que l'effet de certaines régions QTL pourrait être modulé en fonction du statut énergétique du muscle et donc des gènes qui le contrôlent. En effet, alors que plusieurs SNP étaient significatifs au seuil chromosomique dans la lignée pHu+, leurs effets ne sont pas retrouvés dans la lignée pHu-. Les analyses GWAS n'ont pas permis de mettre en évidence de co-localisation entre les régions QTL de WS et de pH ultime (Le Bihan-Duval *et al.*, 2018), n'allant donc pas dans le sens d'un effet pléiotrope de certains gènes. Les interactions entre le contrôle génétique du WS et le niveau des réserves énergétiques musculaires pourraient passer par des mécanismes plus complexes, d'interactions entre de nombreux gènes. La prise en compte de ces effets d'épistasie reste un sujet d'intérêt à la fois pour améliorer la détection des régions QTL dans les analyses GWAS et la prédiction de leurs effets dans les modèles de sélection génomique.

Comme décrit dans le premier article de la thèse, cette première analyse GWAS des défauts WS chez le poulet aura permis d'identifier plusieurs gènes candidats, à la fois positionnels et fonctionnels. La co-localisation entre QTL de WS et eQTL suggère une possible causalité de certains de ces gènes. Tel est le cas pour *LRSAMI*, situé sur le chromosome 17 (**Figure 21**), qui code pour une protéine ligase ubiquitaire impliquée dans diverses fonctions, notamment la régulation des voies de signalisation et l'adhésion cellulaire. Des mutations dans le gène *LRSAMI* sont responsables chez l'homme d'une forme de neuropathie motrice et sensorielle héréditaire, caractérisée par une faiblesse et une atrophie musculaire distale progressive (Guernsey *et al.*, 2010). Un gain important de signification est observé pour le eQTL de *LRSAMI* par rapport au QTL de WS, suggérant une régulation fine de son expression par une ou plusieurs mutations situées dans ou à proximité du gène. À contrario, l'analyse eQTL de 2 autres gènes de la région (*PNPLA7* et *TUBB4B*) semble les exclure en tant que candidats expressionnels.



**Figure 21** : Co-localisation entre QTL du WS et eQTL de LRSAM1 sur le chromosome 17

De façon intéressante, un cis eQTL pour une isoforme de la myosine néonatale à chaîne lourde *MYH1F* a également été observé près du QTL associé au défaut WS de la région d'intérêt du chromosome 18 (**Figure 22**). Les formes embryonnaires (*MYH1B*) et néonatales (*MYH1F*) se retrouvent dans le muscle au cours de son développement ou lors de la régénération des fibres musculaires. La caractérisation moléculaire des lignées pHu a montré que les fibres musculaires des animaux de la lignée pHu+ présentaient un nombre plus élevé de cellules exprimant les isoformes embryonnaires et néonatales (Beauclercq *et al.*, 2017), en même temps qu'une incidence de WS plus élevée que dans la lignée pHu- (Alnahhas *et al.*, 2016). *MYH1F* apparaît donc comme un gène candidat intéressant, marqueur des processus de régénération. Comme pour *LRSAM1* son lien de causalité reste à explorer, d'autant plus que les positions du QTL de WS et du eQTL pour *MYH1F* étaient relativement éloignées (2,77 et 0,58 Mb respectivement).



**Figure 22** : Co-localisation entre QTL du WS et eQTL de MYH1F sur le chromosome 18

Récemment, nous avons pu faire le lien entre les 2 régions QTL de WS identifiées sur GGA17 et GGA18 au sein des lignées pHu et 2 régions majeures identifiées pour le rendement en filet au sein d'une souche label à croissance lente (Allais *et al.*, 2018). Dans cette étude, les 2 SNP les plus significatifs pour le rendement en filet étaient en effet situés au sein de *LRSAMI* (sur GGA17) et de *MYOCD* situé à proximité du cluster de gènes codant pour les myosines (dont *MYH1F*) sur GGA18. *MYOCD* code pour une protéine nucléaire exprimée dans le cœur, l'aorte et les tissus contenant des cellules musculaires lisses. Son invalidation chez la souris conduit à un retard de croissance embryonnaire, à de la létalité mais aussi à de graves défauts vasculaires (Li *et al.*, 2003). L'ensemble de ces informations suggère donc que les régions identifiées sur GGA17 et GGA18 portent des gènes affectant la croissance musculaire (i.e., le rendement en filet) et les défauts musculaires (i.e., le WS). De futures recherches seraient nécessaires pour savoir s'il s'agit des mêmes acteurs moléculaires qui pourraient conduire dans le cas du poulet label à une croissance musculaire harmonieuse (sans défaut) et chez le poulet standard à du WS. L'étude des gènes et des mutations d'intérêt dans des fonds génétiques variés permettrait d'apporter des premières réponses quant au déterminisme génétique de ces caractères qui reste complexe.

Une première phase de validation d'un set de trente marqueurs, composé des SNP les plus significatifs au sein des six principales régions QTL d'intérêt pour le WS (comme discuté dans le papier sur les chromosomes 1, 4, 7, 10, 17 et 18) et au sein de la région eQTL de *LRSAMI*, a pu être réalisée au cours de la thèse. Pour cela, deux populations issues de fonds génétiques différents ont été génotypées pour chacun de ces marqueurs : la lignée à l'origine de la sélection divergente pour le pHu mais qui depuis a continué à être sélectionnée (lignée pHu0, n=178) et une lignée commerciale à fort développement musculaire présentant une proportion significative de défauts WS et WB (lignée WSWB, n=178) et qui a servi de support animal aux analyses histologiques, protéomiques et transcriptomiques de la thèse. Les lignées pHu0 et WSWB présentaient respectivement 32,6% et 31,8% de filets avec du WS modéré ainsi que 33,2% et 22,7% avec du WS sévère. La lignée pHu0 est très peu affectée par le défaut WB puisque seulement 6,2% des filets présentent du WB à l'état modéré, alors que 13,6% des filets présentent du WB modéré et 11,9% du WB sévère dans la lignée WSWB. Sur les 30 marqueurs candidats, seuls 23 ont pu être génotypés. Des tests de  $\chi^2$  ont été réalisés pour tester l'association entre génotype au marqueur et défauts WS et WB, et des analyses de variance pour tester l'effet du génotype au marqueur sur le pHu et le rendement en filet (**Tableau 11**). Sur les 23 marqueurs SNP, 5 étaient fixés dans la lignée WSWB (i.e., M3, M8, M9, M23 et M28) dont 2 étaient également fixés dans la lignée pHu0 (i.e., M8 et M9). Seul le marqueur M30, localisé dans une région intergénique proche de la région QTL du WS sur le chromosome 18, semble associé de manière significative au défaut WS, dans la lignée WSWB. Par contre, 3 marqueurs localisés sur le chromosome 17 sont significativement associés au défaut WB dans les deux lignées (pour M22 et M24) ou uniquement la lignée pHu0 (pour M23). Des associations avec le rendement en filet sont également observées dans la lignée pHu0 pour les marqueurs M22 et M23 (localisés dans le gène *LRSAMI*) et dans la lignée WSWB pour le marqueur M24 (localisé dans un autre gène candidat du chromosome 17, *PNPLA7*). De façon intéressante, l'annotation du marqueur M23 à partir de la base de données NCBI (assemblage Galgal5) indique qu'il se trouve dans un exon du gène *LRSAMI*. Il s'agit d'une mutation « missense », c'est-à-dire que le variant de séquence modifie une base, qui conduit à une séquence d'acides aminés différente mais dont la longueur est préservée.

Cette première phase de validation a permis de confirmer l'intérêt de certaines régions et mutations candidates, notamment sur le chromosome 17 porteur du gène *LRSAMI*. Sa portée reste cependant limitée du fait du faible nombre d'animaux et de mutations génotypées. La démarche doit donc se poursuivre afin de phénotyper et de génotyper à plus large échelle

d'autres populations de référence et de préciser l'apport des mutations génétiques pour la sélection contre les défauts musculaires. Le phénotypage de ces populations pourra bénéficier des différents indicateurs histologiques et moléculaires développés au cours de la thèse, qui permettront d'affiner la relation entre mutations et niveau des lésions musculaires.

**Tableau 11** : Marqueurs SNP d'intérêt

	chr.	position <sup>1</sup> (pb)	GeneID	Symbole	Localisation <sup>1</sup>	Probabilité de l'effet marqueurs dans la lignée pHu0				Probabilité de l'effet des marqueurs dans la lignée WSWB			
						WS	WB	pHu	% Filet	WS	WB	pHu	% Filet
<b>M1</b>	1	87530914	395534	MYH15	intron	0,8	0,6	0,29	0,89	0,15	0,38	0,29	0,79
<b>M3</b>	1	87535913	395534	MYH15	intron	0,8	0,6	0,29	0,89	fixé	fixé	fixé	fixé
<b>M4</b>	1	87538251	395534	MYH15	intron	0,75	0,88	0,57	0,35	0,08	0,11	0,95	0,91
<b>M5</b>	1	87539985	395534	MYH15	intron	0,13	0,17	0,98	0,81	0,25	0,18	0,76	0,75
<b>M6</b>	1	87752766	427960	GUCA1C	intron	0,34	0,75	0,98	0,71	0,30	0,73	0,90	0,48
<b>M8</b>	1	87760490	427960	GUCA1C	intron	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé
<b>M9</b>	1	90725752	374008	EPHA6	intron	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé	fixé
<b>M10</b>	1	91673683	396463	POU2F1	intron	0,26	0,13	0,15	0,12	0,38	0,77	0,14	0,07
<b>M11</b>	1	91701953	396463	POU2F1	intron	0,33	0,73	0,90	0,07	0,84	0,69	0,47	0,23
<b>M12</b>	1	91884118	418448	ZFP92	synonymous codon	0,4	0,58	0,70	0,66	0,87	0,30	0,68	<b>0,03</b>
<b>M14</b>	4	66700840	422764	OCIAD1	intron	0,86	0,34	0,96	0,67	0,55	0,84	0,57	0,63
<b>M15</b>	7	2161777	101747788	LOC101747788	ncRNA	0,36	0,65	0,63	0,13	0,55	0,67	0,51	0,23
<b>M16</b>	10	16429786	101748692	LOC101748692	intron	0,6	0,74	0,90	0,81	0,44	0,60	0,14	0,36
<b>M18</b>	17	1916155	395110	RGS3	intron	0,18	0,22	0,75	<b>0,04</b>	0,40	0,59	0,80	0,64
<b>M19</b>	17	2008784	417267	FKBP15	intron	0,14	0,21	0,52	<b>0,02</b>	0,53	0,68	0,18	0,63
<b>M22</b>	17	2043493	417265	LRSAM1	intron	0,18	<b>0,0009</b>	0,79	<b>0,04</b>	0,27	<b>0,01</b>	0,45	0,32
<b>M23</b>	17	2045460	417265	LRSAM1	exon	0,18	<b>0,0009</b>	0,76	<b>0,04</b>	fixé	fixé	fixé	fixé
<b>M24</b>	17	2166231	427774	PNPLA7	intron	0,27	<b>0,047</b>	0,89	0,59	0,52	<b>0,02</b>	0,13	<b>0,006</b>
<b>M25</b>	17	23100469	417256	MIR4640	intron	0,18	0,87	0,73	0,73	0,36	0,34	0,46	0,30
<b>M26</b>	17	2310607	417256	MIR4640	intron	0,13	0,86	0,73	0,69	0,36	0,34	0,46	0,28
<b>M28</b>	18	2748207	101750482	LOC101750482	ncRNA	0,93	0,88	0,47	0,44	fixé	fixé	fixé	fixé
<b>M29</b>	18	2749329	101750482	LOC101750482	ncRNA	0,93	0,88	0,47	0,44	0,09	0,37	<b>0,004</b>	0,60
<b>M30</b>	18	2766387	-	-	intergénique	0,51	0,22	0,72	0,12	<b>0,02</b>	0,21	0,29	0,19

<sup>1</sup>annotation sur l'assemblage Galgal5 de la base de données NCBI



### **III. Identification d'indicateurs et de biomarqueurs des myopathies WS et WB pouvant servir d'outils de diagnostic dans une perspective d'application en sélection**

#### **III.1 Phénotypes histologiques**

Les analyses histologiques réalisées au travers de différents co-marquages immunohistochimiques révèlent plusieurs indicateurs qui permettent de quantifier précisément les lésions associées à l'établissement des défauts WS et WB dans le muscle. C'est le cas pour le pourcentage de surface marquée au collagène VI (représentatif de la fibrose) ou au bodipy (représentatif de l'adipose), le nombre de capillaires par unité de surface du muscle et le coefficient de variation de la taille des fibres. Ces phénotypes histologiques permettent d'améliorer le diagnostic des myopathies et par voie de conséquence la puissance des dispositifs expérimentaux mis en place pour les étudier. Ainsi, dans notre étude nous avons pu sur la base des observations histologiques repérer trois échantillons du dispositif animal qui avaient été mal classés visuellement et les retirer en vue de l'analyse transcriptomique différentielle. L'utilisation de tels phénotypes permet donc d'accéder à une mesure quantitative beaucoup plus standardisée et précise que les méthodes de classification visuelle ou basée sur la palpation actuellement mises en œuvre en abattoirs et qui vont dépendre de nombreux facteurs liés à l'expérimentateur ou aux conditions de mesure.

Actuellement, l'utilisation du phénotypage histologique peut paraître compliquée à mettre en œuvre de façon routinière chez les sélectionneurs. En effet, l'analyse histologique des muscles par microscopie classique et le traitement des images restent des procédures longues et fastidieuses, difficilement conciliables avec l'analyse de grands effectifs. Par ailleurs, ce type de mesure nécessite forcément le phénotypage des collatéraux puisqu'elle demande un prélèvement musculaire et donc l'abattage des animaux. Toutefois, de récents développements réalisés au laboratoire laissent entrevoir la mise au point d'analyses à « moyen-débit » basées sur l'utilisation d'un scanner qui permet de mesurer très précisément et rapidement la quantité de fluorescence émise suite aux différents marquages des lésions musculaires impliquées dans la mise en place des myopathies chez le poulet. La prochaine étape sera de valider sur des populations de référence l'intérêt d'utiliser ces phénotypes histologiques pour affiner le diagnostic des myopathies et le gain qui pourrait être obtenu en terme de sélection contre les défauts WS et WB.

## III.2 Phénotypes moléculaires

Au-delà de leur utilisation directe à des fins de diagnostic, l'obtention de phénotypes fins histologiques a permis d'établir des corrélations avec les niveaux d'expression de gènes acquis par analyse transcriptomique. Ceci a été possible grâce à la mise en œuvre d'une approche statistique originale, WGCNA pour Weighted Correlation Network Analysis, qui a permis d'étudier les corrélations entre des modules de gènes co-exprimés et les différents phénotypes histologiques. Cette approche nous a permis de considérer l'ensemble des échantillons de notre dispositif (n=24) et d'exploiter toute la variabilité des lésions observées entre échantillons. En partant de la matrice d'expression de l'ensemble des gènes, des modules de gènes co-exprimés sont identifiés et leur information résumée au travers de l'eigengene, correspondant à la première composante principale du module. L'analyse des corrélations entre l'eigengene de chaque module et les différents phénotypes histologiques a permis d'identifier les réseaux de gènes co-exprimés qui étaient les plus corrélés avec les caractères étudiés. Au sein de chaque module, nous avons fait le choix de sélectionner les gènes (i.e., hubgenes) dont l'expression était à la fois fortement corrélée à l'eigengene ( $|r| > 0,7$ ) et aux phénotypes histologiques ( $|r| > 0,7$ ) discriminants les muscles atteints de myopathies sévères (i.e., collagène VI, nombre de capillaires et variation de la taille des fibres). Ces listes de gènes ont été combinées avec celles des gènes DE entre muscles CR-C et CR-WSWB pour identifier les marqueurs les plus pertinents des myopathies sévères. Ainsi, un jeu de 17 biomarqueurs a été proposé. Parmi eux, trois n'étaient pas caractérisés. De manière cohérente, la majorité des gènes choisis grâce à cette approche sont impliqués dans des phénomènes de régénération musculaire, de fibrose, de réponse à l'hypoxie et de guidage axonal, autant de processus biologiques identifiés comme spécifiquement activés dans les muscles sévèrement affectés par les défauts WS et WB. En intégrant les résultats issus de l'analyse génétique du défaut WS, nous avons enrichi ce set de biomarqueurs avec 5 gènes supplémentaires situés dans des régions QTL contrôlant le défaut WS (*MYH15*, *FNI*, *COL6A3*, *MYH1E* et *MYH1F*). Parmi eux, *MYH15* est particulièrement intéressant puisqu'il est à la fois un candidat positionnel, fonctionnel et expressionnel. En effet, le SNP le plus significatif pour le WS identifié sur le chromosome 1 au sein des lignées pHu est localisé dans *MYH15*. *MYH15* code pour une myosine de type lent, normalement exprimée de manière transitoire dans les muscles squelettiques du poussin, puis ré-exprimée lors de la régénération musculaire (Camoretti-Mercado *et al.*, 1993). Cette isoforme de la myosine semble également être impliquée dans la réponse à l'hypoxie chez le bovin (Neary *et al.*, 2014). De plus, elle est respectivement 800 et 60 fois plus exprimée dans les muscles à croissance rapide

atteints de myopathies sévères par rapport aux muscles à croissance lente ou aux muscles à croissance rapide visuellement sains. Toutefois, l'analyse eQTL réalisée pour ce gène au sein des lignées pHu n'a pas permis de mettre en évidence de co-localisation avec le QTL de WS identifié à la position du gène. Plus globalement, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre le niveau d'expression de *MYH15* et la présence du défaut WS dans la population des animaux pHu (p-value = 0,74). Il semble donc que, si le gène est impliqué dans la variabilité génétique du WS expliquée par la région QTL du chromosome 1, cela ne passe pas par une variation de son niveau d'expression dans les lignées pHu. Il serait intéressant de bénéficier du génotypage des animaux de la lignée commerciale à fort développement musculaire pour étudier la régulation de l'expression de ce gène et mieux comprendre son implication dans l'apparition des défauts WS et WB.

Disposer de ce jeu de biomarqueurs mais aussi de phénotypes histologiques fins ouvre des perspectives pour le diagnostic moléculaire des défauts WS et WB. L'intérêt et la généralité de ces outils pour le diagnostic des myopathies doivent maintenant être validés dans d'autres populations présentant des fonds génétiques variés et sur des effectifs plus conséquents. L'utilisation de ces phénotypes moléculaires quantitatifs, beaucoup plus précis que les grilles de notations utilisées actuellement pour estimer la gravité des défauts, représente aussi un atout pour la recherche de mutations ou de marqueurs génétiques dans une perspective d'application en sélection génomique. Ils pourront également être mis à profit dans la recherche de phénotypes non invasifs pour des applications facilitées en sélection ou pour la recherche de solutions d'élevage permettant de réduire l'incidence des défauts dans les souches de poulet à croissance rapide.

## CONCLUSION

---

Les myopathies WS et WB sont un défi majeur pour la filière poulet de chair puisqu'elles pénalisent à la fois la qualité de la viande mais également son image. Si plusieurs solutions se sont montrées efficaces, comme par exemple la limitation de la vitesse de croissance ou encore la diminution du poids et de l'âge à l'abattage, elles entraînent toutes à ce jour des baisses de performances en élevage. Cela amène à explorer les possibilités d'une amélioration génétique des animaux, tirant profit des avancées offertes par les technologies à haut-débit. La thèse visait à y contribuer grâce au développement de nouveaux indicateurs et biomarqueurs permettant un phénotypage fin des défauts, en complément de l'identification de marqueurs génétiques et de gènes candidats utiles au développement de la sélection génomique. L'exploration des mécanismes ayant conduit sur le long terme à l'apparition des myopathies permet par ailleurs d'alimenter la réflexion sur les possibilités ou les limites à concilier croissance et intégrité musculaire.

Le travail de thèse aura permis de préciser l'architecture génétique du défaut WS au sein des lignées divergentes pour le pH ultime. Elle s'est révélée complexe du fait du déterminisme polygénique du défaut et des interactions possibles avec le niveau des réserves énergétiques du muscle. Les approches complémentaires de recherche de QTL et eQTL ont toutefois conduit à l'identification de premiers gènes candidats et de mutations dont les effets restent à explorer à plus large échelle. Les populations animales caractérisées pendant la thèse seront un matériel génétique précieux pour poursuivre ces travaux en intégrant les données de génomique positionnelle et expressionnelle. À court terme, le séquençage tout génome réalisé sur quelques individus à croissance lente (CL) ou à croissance rapide atteints ou non par les défauts (des groupes CR-C et CR-WSWB) devrait permettre d'identifier de nouvelles mutations d'intérêt. À plus long terme, le projet Mille Génomes Poulet qui a pour objectif de rassembler les séquences du génome entier d'animaux du genre Gallus sera également une ressource précieuse pour voir comment ségrégent les variants candidats dans d'autres populations.

L'intégration de différentes approches (histologique, transcriptomique et génétique) menées au cours de la thèse a mis en évidence de nouveaux indicateurs des défauts WS et WB sous la forme de phénotypes histologiques quantitatifs, et de marqueurs géniques dont les profils d'expression sont fortement corrélés aux désordres musculaires impliqués dans le développement des myopathies sévères. Si la sélection génétique ou génomique apparaît comme l'un des leviers prometteurs pour lutter contre les défauts musculaires, son efficacité est aujourd'hui pénalisée par la subjectivité du phénotypage qui reste basé sur une notation visuelle. Les marqueurs histologiques et moléculaires développés lors de la thèse ouvrent des

perspectives d'application intéressantes pour affiner le phénotypage des populations d'intérêt et gagner en efficacité de sélection. Ils pourraient également être mis à profit pour mieux évaluer l'effet des programmes de sélection appliqués de longue date au sein des lignées sur la qualité de leur muscle et la sensibilité aux défauts. Idéalement pour la sélection, il faudrait pouvoir disposer d'indicateurs ou de biomarqueurs accessibles sur les animaux vivants. Différentes voies de développement existent, à partir de techniques d'imagerie ou de tests plasmatiques par exemple. Quelle que soit l'approche retenue, disposer d'une quantification précise des lésions musculaires (au travers des marqueurs histologiques ou géniques) pourra s'avérer fort utile pour l'étape de calibration des modèles de prédiction.

Enfin, la caractérisation moléculaire à haut débit de différentes populations génétiques, à fort développement musculaire ou à croissance lente, nous aura permis de progresser dans notre compréhension de l'étiologie des défauts. Il ressort de nos études que la sélection sur la croissance et le rendement en muscle a conduit à une diminution des réserves en glycogène et de la vascularisation du muscle, créant un environnement métabolique et structural favorable aux dérégulations biologiques associées aux myopathies WS et WB. Les futures analyses génétiques et génomiques des souches à croissance rapide permettront d'évaluer dans quelle mesure suffisamment de variabilité génétique demeure au sein de ces lignées pour diminuer la sensibilité aux défauts musculaires, et quelle sera la contrepartie à attendre en termes de performances de croissance. Il sera également pertinent de réfléchir à d'autres modes de sélection, faisant appel à des génétiques alternatives ou de nouveaux critères de sélection, pour améliorer la durabilité de la production de la viande de poulet.

# BIBLIOGRAPHIE

---

1. Abasht B., Mutryn M. F., Michalek R. D. and Lee W. R., 2016. Oxidative Stress and Metabolic Perturbations in Wooden Breast Disorder in Chickens. *PLoS One*, **11**(4): e0153750.
2. Abasht B., Zhou N., Lee W. R., Zhuo Z. and Peripolli E., 2019. The metabolic characteristics of susceptibility to wooden breast disease in chickens with high feed efficiency. *Poultry Science*.
3. Adzitey F. and Nurul H., 2011. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences - a mini review. *International Food research Journal*, **18**: 11.
4. Allais S., Hennequet-Antier C., Berri C., Salles L., Demeure O. and Le Bihan-Duval E., 2018. Mapping of QTL for chicken body weight, carcass composition, and meat quality traits in a slow-growing line. *Poultry Science*.
5. Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M. and Le Bihan-Duval E., 2014. Selecting broiler chickens for ultimate pH of breast muscle: analysis of divergent selection experiment and phenotypic consequences on meat quality, growth, and body composition traits. *Journal of Animal Science*, **92**(9): 3816-3824.
6. Alnahhas N., Le Bihan-Duval E., Baéza E., Chabault M., Chartrin P., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Meteau K. and Berri C., 2015. Impact of divergent selection for ultimate pH of pectoralis major muscle on biochemical, histological, and sensorial attributes of broiler meat. *Journal of Animal Science*, **93**(9): 4524-4531.
7. Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M. C. and Le Bihan-Duval E., 2016. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genetics*, **17**: 61.
8. Apple J. K. and Yancey J. W. S., 2013. Water-holding capacity of meat. In *The Science of Meat Quality*, Kerth. C.R. (Ed), Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons. Inc. publication, Ames, Iowa, USA: 119-136.
9. Asakura A., Komaki M. and Rudnicki M., 2001. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*, **68**(4-5): 245-253.
10. Baéza E., Arnould C., Jlali M., Chartrin P., Gigaud V., Mercierand F., Durand C., Meteau K., Le Bihan-Duval E. and Berri C., 2012. Influence of increasing slaughter age of chickens on

meat quality, welfare, and technical and economic results. *Journal of Animal Science*, **90**(6): 2003-2013.

11. Baéza E., Bourin M. and Berri C., 2018. Etat des lieux sur les défauts de qualité de la viande de poulets. *Viandes & Produits Carnés*.

12. Bailey R. A., Watson K. A., Bilgili S. F. and Avendano S., 2015. The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. *Poultry Science*, **94**(12): 2870-2879.

13. Baldi G., Soglia F., Mazzoni M., Sirri F., Canonico L., Babini E., Laghi L., Cavani C. and Petracci M., 2018. Implications of white striping and spaghetti meat abnormalities on meat quality and histological features in broilers. *Animal*, **12**(1): 164-173.

14. Baldi G., Soglia F., Laghi L., Tappi S., Rocculi P., Tavaniello S., Prioriello D., Mucci R., Maiorano G. and Petracci M., 2019. Comparison of quality traits among breast meat affected by current muscle abnormalities. *Food Research International*, **115**: 369-376.

15. Barbut S., 1997. Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. *British Poultry Science*, **38**(4): 355-358.

16. Barbut S., Sosnicki A. A., Lonergan S. M., Knapp T., Ciobanu D. C., Gatcliffe L. J., Huff-Lonergan E. and Wilson E. W., 2008. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Science*, **79**(1): 46-63.

17. Bauermeister L. J., Morey A. U., Moran E. T., Singh M., Owens C. M. and McKee S. R., 2009. Occurrence of White Striping in chicken breast fillets in relation to broiler size. *Poultry Science*, **88**(Suppl.1): 33(Abstr.).

18. Beauclercq S., Nadal-Desbarats L., Hennequet-Antier C., Collin A., Tesseraud S., Bourin M., Le Bihan-Duval E. and Berri C., 2016. Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality. *Journal of Proteome Research*, **15**(4): 1168-1178.

19. Beauclercq S., Hennequet-Antier C., Praud C., Godet E., Collin A., Tesseraud S., Metayer-Coustard S., Bourin M., Moroldo M., Martins F., Lagarrigue S., Bihan-Duval E. L. and Berri C., 2017. Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. *Scientific Reports*, **7**(1): 6447.

20. Berri C., Wacrenier N., Millet N. and Le Bihan-Duval E., 2001. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. *Poultry Science*, **80**(7): 833-838.



21. Berri C., 2004. Chapter 2 - Breeding and quality of poultry. *Poultry Meat Processing and Quality*, Mead, G.C. (Ed)(CRC Press, Boca Raton (USA), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge (GBR)): 21-37.
22. Berri C., Debut M., Sante-Lhoutellier V., Arnould C., Boutten B., Sellier N., Baeza E., Jehl N., Jego Y., Duclos M. J. and Le Bihan-Duval E., 2005. Variations in chicken breast meat quality: implications of struggle and muscle glycogen content at death. *British Poultry Science*, **46**(5): 572-579.
23. Berri C., Le Bihan-Duval E., Debut M., Sante-Lhoutellier V., Baeza E., Gigaud V., Jego Y. and Duclos M. J., 2007. Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. *Journal of Animal Science*, **85**(8): 2005-2011.
24. Berri C., Besnard J. and Relandeau C., 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases drip loss of broiler breast meat. *Poultry Science*, **87**(3): 480-484.
25. Bianchi M., Petracci M., Franchini A. and Cavani C., 2006. The occurrence of deep pectoral myopathy in roaster chickens. *Poultry Science*, **85**(10): 1843-1846.
26. Bodle B. C., Alvarado C., Shirley R. B., Mercier Y. and Lee J. T., 2018. Evaluation of different dietary alterations in their ability to mitigate the incidence and severity of woody breast and white striping in commercial male broilers. *Poultry Science*, **97**(9): 3298-3310.
27. Boerboom G., van Kempen T., Navarro-Villa A. and Perez-Bonilla A., 2018. Unraveling the cause of white striping in broilers using metabolomics. *Poultry Science*, **97**(11): 3977-3986.
28. Bowker B. and Zhuang H., 2016. **Impact of white striping on functionality attributes of broiler breast meat**. *Poultry Science*, **95**(8): 1957-1965.
29. Brack A. S., Conboy M. J., Roy S., Lee M., Kuo C. J., Keller C. and Rando T. A., 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*, **317**(5839): 807-810.
30. Brambila G. S., Bowker B. C., Chatterjee D. and Zhuang H., 2018. Descriptive texture analyses of broiler breast fillets with the wooden breast condition stored at 4 degrees C and -20 degrees C. *Poultry Science*, **97**(5): 1762-1767.
31. Briskey E. J., 1964. Etiological Status and Associated Studies of Pale, Soft, Exudative Porcine Musculature. *Advances in Food Research*, **13**: 89-178.
32. Cai K., Shao W., Chen X., Campbell Y. L., Nair M. N., Suman S. P., Beach C. M., Guyton M. C. and Schilling M. W., 2018. Meat quality traits and proteome profile of woody broiler breast (pectoralis major) meat. *Poultry Science*, **97**(1): 337-346.

33. Camoretti-Mercado B., Dizon E., Jakovcic S. and Zak R., 1993. Differential expression of ventricular-like myosin heavy chain mRNA in developing and regenerating avian skeletal muscles. *Cellular and Molecular Biology Research*, **39**(5): 425-437.
34. Cavani C., Petracci M., Trocino A. and Xiccato G., 2009. Advances in research on poultry and rabbit meat quality. *Italian Journal of animal Science*, **8**: 741-750.
35. Cavitt L. C., Hargis B. M. and Owens C. M., 2004. The use of halothane and succinylcholine to identify broilers prone to developing pale, soft, exudative meat. *Poultry Science*, **83**(8): 1440-1444.
36. CBSNews. (2016). "'Woody breast' could bite the chicken business." Retrieved december, 2018, from <https://www.cbsnews.com/news/woody-breast-could-bite-the-chicken-business/>.
37. Cemin H. S., Vieira S. L., Stefanello C., Kindlein L., Ferreira T. Z. and Fireman A. K., 2018. Broiler responses to increasing selenium supplementation using Zn-L-selenomethionine with special attention to breast myopathies. *Poultry Science*, **97**(5): 1832-1840.
38. Chabault M., Baeza E., Gigaud V., Chartrin P., Chapuis H., Boulay M., Arnould C., D'Abbadie F., Berri C. and Le Bihan-Duval E., 2012. Analysis of a slow-growing line reveals wide genetic variability of carcass and meat quality-related traits. *BMC Genetics*, **13**: 90.
39. Chatterjee D., Zhuang H., Bowker B. C., Rincon A. M. and Sanchez-Brambila G., 2016. Instrumental texture characteristics of broiler pectoralis major with the wooden breast condition. *Poultry Science*, **95**(10): 2449-2454.
40. Clark D. L. and Velleman S. G., 2016. Spatial influence on breast muscle morphological structure, myofiber size, and gene expression associated with the wooden breast myopathy in broilers. *Poultry Science*, **95**(12): 2930-2945.
41. Clark D. L., Walter K. G. and Velleman S. G., 2017. Incubation temperature and time of hatch impact broiler muscle growth and morphology. *Poultry Science*, **96**(11): 4085-4095.
42. Cordova-Noboa H. A., Oviedo-Rondon E. O., Sarsour A. H., Barnes J., Ferzola P., Rademacher-Heilshorn M. and Braun U., 2018a. Performance, meat quality, and pectoral myopathies of broilers fed either corn or sorghum based diets supplemented with guanidinoacetic acid. *Poultry Science*, **97**(7): 2479-2493.
43. Cordova-Noboa H. A., Oviedo-Rondon E. O., Sarsour A. H., Barnes J., Sappota D., Lopez D., Gross L., Rademacher-Heilshorn M. and Braun U., 2018b. Effect of guanidinoacetic acid supplementation on live performance, meat quality, pectoral myopathies and blood parameters of male broilers fed corn-based diets with or without poultry by-products. *Poultry Science*, **97**(7): 2494-2505.

44. Cruz R. F., Vieira S. L., Kindlein L., Kipper M., Cemin H. S. and Rauber S. M., 2016. Occurrence of white striping and wooden breast in broilers fed grower and finisher diets with increasing lysine levels. *Poultry Science*, **96**(2): 501-510.
45. Dalgaard L. B., Rasmussen M. K., Bertram H. C., Jensen J. A., Møller H. S., Aaslyng M. D., Hejbøl E. K., Pederson J. R., Elsser-Gravesen D. and Young J. F., 2018. Classification of wooden breast myopathy in chicken pectoralis major by a standardised method and association with conventional quality assessments. *International Journal of Food Science and Technology*, **53**(7): 1-9.
46. Dalle Zotte A., Cecchinato M., Quartesan A., Bradanovic J., Tasoniero G. and Puolanne E., 2014. How does "wooden breast" myodegeneration affect poultry meat quality ? *60th International Congress of Meat Science and Technology*: 476-479.
47. Dalle Zotte A., Tasoniero G., Russo E., Longoni C. and Cecchinato M., 2015. Impact of coccidiosis control program and feeding plan on white striping prevalence and severity degree on broiler breast fillets evaluated at three growing ages. *Poultry Science*, **94**: 2114-2123.
48. Dalle Zotte A., Tasoniero G., Puolanne E., Remignon H., Cecchinato M., Catelli E. and Cullere M., 2017. Effet of "Wooden Breast" appearance on poultry meat quality, histological traits, and lesions characterization. *Czech. Journal of Animal Science*, **62**(2): 51-57.
49. Daughtry M. R., Berio E., Shen Z., Suess E. J. R., Shah N., Geiger A. E., Berguson E. R., Dalloul R. A., Persia M. E., Shi H. and Gerrard D. E., 2017. Satellite cell-mediated breast muscle regeneration decreases with broiler size. *Poultry Science*, **96**(9): 3457-3464.
50. Davis D. E. and Stewart H., 2002. Changing consumer demands create opportunities for US food system. *Food Review*, **25**: 19-23.
51. Debut M., Berri C., Baeza E., Sellier N., Arnould C., Guemene D., Jehl N., Boutten B., Jago Y., Beaumont C. and Le Bihan-Duval E., 2003. Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress conditions. *Poultry Science*, **82**(12): 1829-1838.
52. Debut M., Berri C., Arnould C., Guemene D., Sante-Lhoutellier V., Sellier N., Baeza E., Jehl N., Jago Y., Beaumont C. and Le Bihan-Duval E., 2005. Behavioural and physiological responses of three chicken breeds to pre-slaughter shackling and acute heat stress. *British Poultry Science*, **46**(5): 527-535.
53. Dickinson E. M., Stevens J. O. and Helfer D. H. A., 1968. Degenerative myopathy in Turkeys. *In Proceedings of 17th Western Poultry Disease Conference, Davis, CA, USA*: 6.
54. Dransfield E. and Sosnicki A. A., 1999. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry Science*, **78**(5): 743-746.

55. Faucitano L., Ielo M. C., Ster C., Lo Fiego D. P., Methot S. and Saucier L., 2010. Shelf life of pork from five different quality classes. *Meat Science*, **84**(3): 466-469.
56. Ferreira T. Z., Casagrande R. A., Vieira S. L., Driemeier D. and Kindlein L., 2014. An investigation of a reported case of white striping in broilers. *Journal of Apply Poultry Research*, **23**: 1-6.
57. Fletcher D. L., 1999. Poultry meat color. *Poultry Meat Science*, **25**: 159-175.
58. Fletcher D. L., Qiao M. and Smith D. P., 2000. The relationship of raw broiler breast meat color and pH to cooked meat color and pH. *Poultry Science*, **79**(5): 784-788.
59. Geronimo B. C., Mastelini S. M., Carvalho R. H., Barbon Junior S., Barbin D. F., Shimokomaki M. and Ida E., 2019. Computer vision system and near-infrared spectroscopy for identification and classification of chicken with wooden breast, and physicochemical and technological characterization. *Infrared Physics and Technology*, **96**: 303-310.
60. Gigaud V., Le Bihan-Duval E. and Berri C., 2009. Facteurs de variation de l'aptitude à la transformation de la viande de volaille. *8èmes Journée de la Recherche Avicole*, **25-26/03/2009**: 124-131.
61. Griffin J. R., Moraes L., Wick M. and Lilburn M. S., 2018. Onset of white striping and progression into wooden breast as defined by myopathic changes underlying Pectoralis major growth. Estimation of growth parameters as predictors for stage of myopathy progression. *Avian Pathology*, **47**(1): 2-13.
62. Guardia S., Lessire M., Corniaux A., Metayer-Coustard S., Mercierand F., Tesseraud S., Bouvarel I. and Berri C., 2014. Short-term nutritional strategies before slaughter are effective in modulating the final pH and color of broiler breast meat. *Poultry Science*, **93**(7): 1764-1773.
63. Guernsey D. L., Jiang H., Bedard K., Evans S. C., Ferguson M., Matsuoka M., Macgillivray C., Nightingale M., Perry S., Rideout A. L., Orr A., Ludman M., Skidmore D. L., Benstead T. and Samuels M. E., 2010. Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *PLoS Genetics*, **6**(8).
64. Guetchom B., Venne D., Chenier S. and Chorfi Y., 2012. Effect of extra dietary vitamin E on preventing nutritional myopathy in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, **21**: 548-555.
65. Hamm R., 1960. Biochemistry of meat hydration. *Advances in Food Research*, **10**: 355-463.

66. Havenstein G. B., Ferket P. R. and Qureshi M. A., 2003. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, **82**(10): 1509-1518.
67. Hoving-Bolink A. H., Kranen R. W., Klont R. E., Gerritsen C. L. and de Greef K. H., 2000. Fibre area and capillary supply in broiler breast muscle in relation to productivity and ascites. *Meat Science*, **56**(4): 397-402.
68. Huang X. and Ahn D. U., 2018. The Incidence of Muscle Abnormalities in Broiler Breast Meat - A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **38**(5): 835-850.
69. ITAVI. (2017). "Les défauts de carcasse du poulet de chair - Référentiel visuel d'identification." from <https://www.itavi.asso.fr/content/les-defauts-de-carcasse-du-poulet-de-chair>.
70. ITAVI, 2018. Situation du marché des volailles de chair - Édition avril 2018.
71. Jiang H., Yoon S. C., Zhuang H., Wang W., Li Y. and Yang Y., 2019. Integration of spectral and textural features of visible and near-infrared hyperspectral imaging for differentiating between normal and white striping broiler breast meat. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **213**: 118-126.
72. Jlali M., Graulet B., Chauveau-Duriot B., Chabault M., Godet E., Leroux S., Praud C., Le Bihan-Duval E., Duclos M. J. and Berri C., 2012. A mutation in the promoter of the chicken beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1 gene alters xanthophyll metabolism through a selective effect on its mRNA abundance in the breast muscle. *Journal of Animal Science*, **90**(12): 4280-4288.
73. Kato T., Mastelini S. M., Centini Campos G. F., Ayub da Costa Barbon A. P., Prudencio S. H., Shimokomaki M., Lourenço Soares A. and Barbon Jr S., 2018. Dealing with white striping broiler breast: from computer vision classification to consumer acceptance. *Asian-Australas Journal of Animal Science*
74. Kawasaki T., Yoshida T. and Watanabe T., 2016. Simple method for screening the affected birds with remarkably hardened pectoralis major muscles among broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, **53**: 291-297.
75. Kawasaki T., Iwasaki T., Yamada M., Yoshida T. and Watanabe T., 2018. Rapid growth rate results in remarkably hardened breast in broilers during the middle stage of rearing: A biochemical and histopathological study. *PLoS One*, **13**(2): e0193307.
76. Kennedy O. B., Stewart-Knox B. J., Mitchell P. C. and Thurnham D. I., 2004. Consumer perceptions of poultry meat: a qualitative analysis. *Nutrition & Food Science*, **34**(3): 122-129.

77. Kijowski J. and Konstanczak M., 2009. Deep pectoral myopathy in broiler chickens. *Bulletin in the Veterinary Institute in Pulawy*, **53**: 487-491.
78. Kijowski J., Kupinska E., Stangierski J., Tomaszewska-Gras J. and Szablewski T., 2014. Paradigm of deep pectoral myopathy in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, **70**: 125-138.
79. Kuttappan V. A., Brewer V. B., Clark F. D., McKee S. R., Meullenet J. F., Emmert J. L. and Owens C. M., 2009. Effect of white striping on the histological and meat quality characteristics of broiler fillets. *Poultry Science*, **88**(E-Suppl.1): 136-137.
80. Kuttappan V. A., Brewer V. B., Apple J. K., Waldroup P. W. and Owens C. M., 2012a. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*, **91**(10): 2677-2685.
81. Kuttappan V. A., Goodgame S. D., Bradley C. D., Mauromoustakos A., Hargis B. M., Waldroup P. W. and Owens C. M., 2012b. Effect of different levels of dietary vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopherol acetate) on the occurrence of various degrees of white striping on broiler breast fillets. *Poultry Science*, **91**(12): 3230-3235.
82. Kuttappan V. A., Lee Y. S., Erf G. F., Meullenet J. F., McKee S. R. and Owens C. M., 2012c. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poultry Science*, **91**(5): 1240-1247.
83. Kuttappan V. A., Brewer V. B., Mauromoustakos A., McKee S. R., Emmert J. L., Meullenet J. F. and Owens C. M., 2013a. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*, **92**(3): 811-819.
84. Kuttappan V. A., Huff G. R., Huff W. E., Hargis B. M., Apple J. K., Coon C. and Owens C. M., 2013b. Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poultry Science*, **92**(2): 339-345.
85. Kuttappan V. A., Shivaprasad H. L., Shaw D. P., Valentine B. A., Hargis B. M., Clark F. D., McKee S. R. and Owens C. M., 2013c. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poultry Science*, **92**(2): 331-338.
86. Kuttappan V. A., Hargis B. M. and Owens C. M., 2016. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. *Poultry Science*, **95**(11): 2724-2733.
87. Kuttappan V. A., Bottje W., Ramnathan R., Hartson S. D., Coon C. N., Kong B. W., Owens C. M., Vazquez-Anon M. and Hargis B. M., 2017a. Proteomic analysis reveals changes in carbohydrate and protein metabolism associated with broiler breast myopathy. *Poultry Science*, **96**(8): 2992-2999.

88. Kuttappan V. A., Owens C. M., Coon C., Hargis B. M. and Vazquez-Anon M., 2017b. Incidence of broiler breast myopathies at 2 different ages and its impact on selected raw meat quality parameters. *Poultry Science*, **96**(8): 3005-3009.
89. Le Bihan-Duval E., Berri C., Baeza E., Millet N. and Beaumont C., 2001. Estimation of the genetic parameters of meat characteristics and of their genetic correlations with growth and body composition in an experimental broiler line. *Poultry Science*, **80**(7): 839-843.
90. Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C. M., Sellier N., Sante-Lhoutellier V., Jego Y. and Beaumont C., 2008. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genetics*, **9**: 53.
91. Le Bihan-Duval E., Nadaf J., Berri C., Pitel F., Graulet B., Godet E., Leroux S. Y., Demeure O., Lagarrigue S., Duby C., Cogburn L. A., Beaumont C. M. and Duclos M. J., 2011. Detection of a Cis [corrected] eQTL controlling BCMO1 gene expression leads to the identification of a QTG for chicken breast meat color. *PLoS One*, **6**(7): e14825.
92. Le Bihan-Duval E. and Berri C. (2017). Genetics and Genomics for Improving Poultry Meat Quality. *Poultry Quality Evaluation : Quality Attributes and Consumer Values*. M. P. a. C. Berri. Duxford (GBR), Woodhead Publishing Elsevier.
93. Le Bihan-Duval E., Hennequet-Antier C., Berri C., Beauclercq S. A., Bourin M. C., Boulay M., Demeure O. and Boitard S., 2018. Identification of genomic regions and candidate genes for chicken meat ultimate pH by combined detection of selection signatures and QTL. *BMC Genomics*, **19**(1): 294.
94. Le Roy P., Naveau J., Elsen J. M. and Sellier P., 1990. Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs. *Genetics Research*, **55**(1): 33-40.
95. Lesiów T. and Kijowski J., 2003. Impact of PSE and DFD meat on poultry processing – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **12**(53): 3-8.
96. Li S., Wang D. Z., Wang Z., Richardson J. A. and Olson E. N., 2003. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **100**(16): 9366-9370.
97. Lien R. J., Bilgili S. F., Hess J. B. and Joiner K. S., 2011. Finding answers to "green muscle disease". *Watt Poultry USA*, **5**: 15-18.
98. Livingston M. L., Ferket P. R., Brake J. and Livingston K. A., 2018. Dietary amino acids under hypoxic conditions exacerbates muscle myopathies including wooden breast and white stripping. *Poultry Science*, **98**(3): 1517-1527.

99. Livingston M. L., Landon C., Barnes H. J. and Brake J., 2019a. White striping and wooden breast myopathies of broiler breast muscle is affected by time-limited feeding, genetic background, and egg storage. *Poultry Science*, **98**(1): 217-226.
100. Livingston M. L., Landon C. D., Barnes H. J., Brake J. and Livingston K. A., 2019b. Dietary potassium and available phosphorous on broiler growth performance, carcass characteristics, and wooden breast. *Poultry Science*.
101. Lorenzi M., Mudalal S., Cavani C. and Petracci M., 2014. Incidence of white striping under commercial conditions in medium and heavy broiler chickens in Italy. *Journal of Applied Poultry Research*, **23**: 754-758.
102. Lusk J. L., 2018. Consumer preferences for and beliefs about slow growth chicken. *Poultry Science*, **97**(12): 4159-4166.
103. Magdelaine P., Spiess M. P. and Valceschini E., 2008. Poultry meat consumption trends in Europe. *World's Poultry Science Journal*, **64**(1): 53-63.
104. Maiorano G., 2017. Meat defects and emergent muscle myopathies in broiler chickens: implications for the modern poultry industry. *Scientific Annals of Polish Society of Animal Production*, **13**: 43-51.
105. Malila Y., J U. C., Srimarut Y., Chaiwiwattrakul P., Uengwetwanit T., Arayamethakorn S., Punyapornwithaya V., Sansamur C., Kirschke C. P., Huang L., Tapaamorndech S., Petracci M., Rungrassamee W. and Visessanguan W., 2018. Monitoring of white striping and wooden breast cases and impacts on quality of breast meat collected from commercial broilers (*Gallus gallus*). *Asian-Australas Journal of Animal Science*, **31**(11): 1807-1817.
106. Marchesi J. A. P., Ibelli A. M. G., Peixoto J. O., Cantao M. E., Pandolfi J. R. C., Marciano C. M. M., Zanella R., Settles M. L., Coutinho L. L. and Ledur M. C., 2018. Whole transcriptome analysis of the pectoralis major muscle reveals molecular mechanisms involved with white striping in broiler chickens. *Poultry Science*, **98**(2): 590-601.
107. Martens H., Stabursvik E. and Martens M., 1982. Texture and colour changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. *Journal of Texture Studies*, **13**: 291-309.
108. Maxwell A. D., Bowker B. C., Zhuang H., Chatterjee D. and Adhikari K., 2018. Descriptive sensory analysis of marinated and non-marinated wooden breast fillet portions. *Poultry Science*, **97**(8): 2971-2978.
109. Mazzoni M., Petracci M., Meluzzi A., Cavani C., Clavenzani P. and Sirri F., 2015. Relationship between pectoralis major muscle histology and quality traits of chicken meat. *Poultry Science*, **94**(1): 123-130.



110. Meloche K. J., Dozier W. A., 3rd, Brandebourg T. D. and Starkey J. D., 2018a. Skeletal muscle growth characteristics and myogenic stem cell activity in broiler chickens affected by wooden breast. *Poultry Science*, **97**(12): 4401-4414.
111. Meloche K. J., Fancher B. I., Emmerson D. A., Bilgili S. F. and Dozier W. A., 3rd, 2018b. Effects of reduced dietary energy and amino acid density on Pectoralis major myopathies in broiler chickens at 36 and 49 days of age. *Poultry Science*, **97**(5): 1794-1807.
112. Meloche K. J., Fancher B. I., Emmerson D. A., Bilgili S. F. and Dozier W. A., 3rd, 2018c. Effects of reduced digestible lysine density on myopathies of the Pectoralis major muscles in broiler chickens at 48 and 62 days of age. *Poultry Science*, **97**(9): 3311-3324.
113. Meloche K. J., Fancher B. I., Emmerson D. A., Bilgili S. F. and Dozier W. A., 3rd, 2018d. Effects of quantitative nutrient allocation on myopathies of the Pectoralis major muscles in broiler chickens at 32, 43, and 50 days of age. *Poultry Science*, **97**(5): 1786-1793.
114. Milan D., Jeon J. T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Iannuccelli N., Rask L., Ronne H., Lundstrom K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Roy P. L., Chardon P. and Andersson L., 2000. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, **288**(5469): 1248-1251.
115. Mudalal S., Babini E., Cavani C. and Petracci M., 2014. Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by white striping. *Poultry Science*, **93**(8): 2108-2116.
116. Mudalal S., Lorenzi M., Soglia F., Cavani C. and Petracci M., 2015. Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal*, **9**(4): 728-734.
117. Mutryn M. F., Brannick E. M., Fu W., Lee W. R. and Abasht B., 2015. Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. *BMC Genomics*, **16**: 399.
118. Neary M. T., Neary J. M., Lund G. K., Holt T. N., Garry F. B., Mohun T. J. and R.A. B., 2014. Myosin heavy chain 15 is associated with bovine pulmonary arterial pressure. *Pulmonary Circulation*, **4**(3): 496-503.
119. Norring M., Valros A., Valaja J., Sihvo H. K., Immonen K. and Puolanne E., 2018. Wooden breast myopathy links with poorer gait in broiler chickens. *Animal*: 1-6.
120. OCDE-FAO, 2016. Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2016-2025.

121. Owens C. M., Matthews N. S. and Sam A. R., 2000. The use of halothane gas to identify turkeys prone to developing pale, exudative meat when transported before slaughter. *Poultry Science*, **79**(5): 789-795.
122. Pampouille E., Berri C., Boitard S., Hennequet-Antier C., Beauclercq S. A., Godet E., Praud C., Jegou Y. and Le Bihan-Duval E., 2018. Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens. *BMC Genomics*, **19**(1): 202.
123. Papah M. B., Brannick E. M., Schmidt C. J. and Abasht B., 2017. Evidence and role of phlebitis and lipid infiltration in the onset and pathogenesis of Wooden Breast Disease in modern broiler chickens. *Avian Pathology*, **46**(6): 623-643.
124. Papah M. B., Brannick E. M., Schmidt C. J. and Abasht B., 2018. Gene expression profiling of the early pathogenesis of wooden breast disease in commercial broiler chickens using RNA-sequencing. *PLoS One*, **13**(12): e0207346.
125. Petracci M. and Cavani C., 2012. Muscle growth and poultry meat quality issues. *Nutrients*, **4**(1): 1-12.
126. Petracci M., Mudalal S., Bonfiglio A. and Cavani C., 2013. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*, **92**(6): 1670-1675.
127. Petracci M., Mudalal S., Babini E. and Cavani C., 2014. Effect of white striping on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. *Italian Journal of animal Science*, **13**(3138): 179-183.
128. Petracci M., Mudalal S., Soglia F. and Cavani C., 2015. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, **71**: 363-373.
129. Petracci M., Soglia F. and Berri C. (2017). Muscle Metabolism and Meat Quality Abnormalities. *Poultry Quality Evaluation : Quality Attributes and Consumer Values*. M. P. a. C. Berri. Duxford (GBR), Woodhead Publishing Elsevier.
130. Petracci M., Soglia F., Madruga M., Carvalho L., Ida E. and Estevez M., 2019. Wooden-Breast, White Striping, and Spaghetti Meat: Causes, Consequences and Consumer Perception of Emerging Broiler Meat Abnormalities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
131. Radaelli G., Piccirillo A., Birolo M., Bertotto D., Gratta F., Ballarin C., Vascellari M., Xiccato G. and Trocino A., 2016. Effect of age on the occurrence of muscle fiber degeneration associated with myopathies in broiler chickens submitted to feed restriction. *Poultry Science*, **96**(2):309-319.

132. Russo E., Drigo M., Longoni C., Pezzotti R., Fasoli P. and Recordati C., 2015. Evaluation of White Striping prevalence and predisposing factors in broilers at slaughter. *Poultry Science*, **94**(8): 1843-1848.
133. Sachs N. J., Hampton A. R., Foster K. K., Pechanec M. Y., Henderson J. D., King A. J. and Mienaltowski M. J., 2019. The effects of an alternative diet regimen with natural methionine ingredients on white striping breast myopathy in broiler chickens. *Poultry Science*, **98**(1): 413-421.
134. Sanchez Brambila G., Bowker B. C. and Zhuang H., 2016. Comparison of sensory texture attributes of broiler breast fillets with different degrees of white striping. *Poultry Science*, **95**(10): 2472-2476.
135. Severyn M. K., Brannick E. M., Bautista D. A. and Dekich M. A., 2019. Wooden breast syndrome in gastrocnemius muscle of roaster chickens leading to muscle tendon rupture and leg condemnation. *Avian Diseases*, **63**(1): 102-106.
136. Sihvo H. K., Immonen K. and Puolanne E., 2013. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Veterinary Pathology*, **51**(3): 619-623.
137. Sihvo H. K., Lindén J., Airas N., Immonen K., Valaja J. and Puolanne E., 2016. Wooden Breast Myodegeneration of Pectoralis Major Muscle Over the Growth Period in Broilers. *Veterinary Pathology*, **54**(1): 119-128.
138. Sihvo H. K., Airas N., Linden J. and Puolanne E., 2018. Pectoral Vessel Density and Early Ultrastructural Changes in Broiler Chicken Wooden Breast Myopathy. *Journal of Comparative Pathology*, **161**: 1-10.
139. Siller W. G., 1985. Deep pectoral myopathy: a penalty of successful selection for muscle growth. *Poultry Science*, **64**(8): 1591-1595.
140. Sirri F., Maiorano G., Tavaniello S., Chen J., Petracci M. and Meluzzi A., 2016. Effect of different levels of dietary zinc, manganese, and copper from organic or inorganic sources on performance, bacterial chondronecrosis, intramuscular collagen characteristics, and occurrence of meat quality defects of broiler chickens. *Poultry Science*, **95**(8): 1813-1824.
141. Sobotik E. B., Lee J. T., Hagerman S. and Archer G. S., 2018. Evaluation of the use of phosphatidic acid in the diet on growth performance and breast meat yield in broilers. *Animal*, **8**(87).
142. Soglia F., Laghi L., Canonico L., Cavani C. and Petracci M., 2016a. Functional property issues in broiler breast meat related to emerging muscle abnormalities. *Food Research International*, **89**: 1071-1076.

143. Soglia F., Mudalal S., Babini E., Di Nunzio M., Mazzoni M., Sirri F., Cavani C. and Petracci M., 2016b. Histology, composition, and quality traits of chicken Pectoralis major muscle affected by wooden breast abnormality. *Poultry Science*, **95**(3): 651-659.
144. Soglia F., Gao J., Mazzoni M., Puolanne E., Cavani C., Petracci M. and Ertbjerg P., 2017. Superficial and deep changes of histology, texture and particle size distribution in broiler wooden breast muscle during refrigerated storage. *Poultry Science*, **96**(9): 3465-3472.
145. Soglia F., Baldi G., Laghi L., Mudalal S., Cavani C. and Petracci M., 2018. Effect of white striping on turkey breast meat quality. *Animal*, **12**(10): 2198-2204.
146. Solomon M. B., Van Laack R. L. J. M. and Eastridge J. S., 1998. Biophysical basis of Pale, Exudative (PSE) pork and poultry muscle: a review. *Journal of Muscle Foods*, **9**: 1-11.
147. Sosnicki A., Cassens R. G., McIntyre D. R., Vimini R. J. and Greaser M. L., 1989. Incidence of microscopically detectable degenerative characteristics in skeletal muscle of turkey. *British Poultry Science*, **30**(1): 69-80.
148. Sun X., Koltes D. A., Coon C. N., Chen K. and Owens C. M., 2018. Instrumental compression force and meat attribute changes in woody broiler breast fillets during short-term storage. *Poultry Science*, **97**(7): 2600-2606.
149. Sundekilde U. K., Rasmussen M. K., Young J. F. and Bertram H. C., 2017. High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy reveals that pectoralis muscle dystrophy in chicken is associated with reduced muscle content of anserine and carnosine. *Food Chemistry*, **217**: 151-154.
150. Tasoniero G., Cullere M., Cecchinato M., Puolanne E. and Dalle Zotte A., 2016a. Technological quality, mineral profile, and sensory attributes of broiler chicken breasts affected by White Striping and Wooden Breast myopathies. *Poultry Science*, **95**(11): 2707-2714.
151. Tasoniero G., Cullere M. and Dalle Zotte A., 2016b. Effect of White Striping and Wooden Breast occurrence on broiler quail and slow-growing chicken carcass and meat quality. *Proceedings of XXV World's Poultry Congress, Beijing (China)*, S10-0036.
152. TheIndependent. (2017). "Why you should stop eating chicken breast with white stripes." Retrieved December, 2018, from <https://www.independent.co.uk/life-style/health-and-families/chicken-breasts-white-stripes-avoid-poultry-factory-farms-fat-a7569656.html>.
153. TheSun. (2017). "Why you really need to look out for these white stripes in your raw chicken." Retrieved December, 2018, from <https://www.thesun.co.uk/living/2827675/why-you-really-need-to-look-out-for-these-white-stripes-in-your-raw-chicken/>.

154. TheWallStreetJournal. (2016). "Bigger Chickens Bring a Tough New Problem: 'Woody Breast'." Retrieved December, 2018, from <https://www.wsj.com/articles/bigger-chickens-bring-a-tough-new-problem-woody-breast-1459207291>.
155. Tijare V. V., Yang F. L., Kuttappan V. A., Alvarado C. Z., Coon C. N. and Owens C. M., 2016. Meat quality of broiler breast fillets with white striping and woody breast muscle myopathies. *Poultry Science*, **95**(9): 2167-2173.
156. Traffano-Schiffo M. V., Castro-Giraldez M., Colom R. J. and Fito P. J., 2017. Development of a Spectrophotometric System to Detect White Striping Physiopathy in Whole Chicken Carcasses. *Sensors (Basel)*, **17**(5).
157. Traffano-Schiffo M. V., Castro-Giraldez M., Colom R. J. and Fito P. J., 2018. Innovative photonic system in radiofrequency and microwave range to determine chicken meat quality. *Journal of Food Engineering*, **239**: 1-7.
158. Trocino A., Piccirillo A., Birolo M., Radaelli G., Bertotto D., Filiou E., Petracci M. and Xiccato G., 2015. Effect of genotype, gender and feed restriction on growth, meat quality and the occurrence of white striping and wooden breast in broiler chickens. *Poultry Science*, **94**(12): 2996-3004.
159. Velleman S. G. and Clark D. L., 2015. Histopathologic and Myogenic Gene Expression Changes Associated with Wooden Breast in Broiler Breast Muscles. *Avian Diseases*, **59**(3): 410-418.
160. Velleman S. G., Clark D. L. and Tonniges J. R., 2017. Fibrillar Collagen Organization Associated with Broiler Wooden Breast Fibrotic Myopathy. *Avian Diseases*, **61**(4): 481-490.
161. Velleman S. G., Clark D. L. and Tonniges J. R., 2018. The Effect of the Wooden Breast Myopathy on Sarcomere Structure and Organization. *Avian Diseases*, **62**(1): 28-35.
162. Wheeler B. R., McKee S. R., Matthews N. S., Miller R. K. and Sams A. R., 1999. A halothane test to detect turkeys prone to developing pale, soft, and exudative meat. *Poultry Science*, **78**(11): 1634-1638.
163. Wold J. P., Veiseth-Kent E., Host V. and Lovland A., 2017. Rapid on-line detection and grading of wooden breast myopathy in chicken fillets by near-infrared spectroscopy. *PLoS One*, **12**(3): e0173384.
164. Wold J. P., Mage I., Lovland A., Sanden K. W. and Ofstad R., 2019. Near-infrared spectroscopy detects woody breast syndrome in chicken fillets by the markers protein content and degree of water binding. *Poultry Science*, **98**(1): 480-490.

165. Xiao S. and Owens C., 2016a. Effect of short term freezer storage on hardness of woody breast fillets. *Proceedings of International Poultry Scientific Forum, atlanta, Georgia (USA)*, P214.
166. Xiao S. and Owens C., 2016b. The relationship between instrumental compression forces and meat quality traits of woody breast fillets during short-term storage. *Proceedings of International Poultry Scientific Forum, Atlanta, Georgia (USA)*, P211.
167. Yang W. and Hu P., 2018. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *Journal of Orthopaedic Translation*, **13**: 25-32.
168. Zahoor I., Mitchell M. A., Hall S., Beard P. M., Gous R. M., De Koning D. J. and Hocking P. M., 2016. Predicted optimum ambient temperatures for broiler chickens to dissipate metabolic heat do not affect performance or improve breast muscle quality. *British Poultry Science*, **57**(1): 134-141.
169. Zambonelli P., Zappaterra M., Soglia F., Petracci M., Sirri F., Cavani C. and Davoli R., 2016. Detection of differentially expressed genes in broiler pectoralis major muscle affected by White Striping - Wooden Breast myopathies. *Poultry Science*, **95**(12): 2771-2785.
170. Zampiga M., Laghi L., Petracci M., Zhu C., Meluzzi A., Dridi S. and Sirri F., 2018. Effect of dietary arginine to lysine ratios on productive performance, meat quality, plasma and muscle metabolomics profile in fast-growing broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **9**: 79.
171. Zampiga M., Soglia F., Petracci M., Meluzzi A. and Sirri F., 2019. Effect of different arginine-to-lysine ratios in broiler chicken diets on the occurrence of breast myopathies and meat quality attributes. *Poultry Science*.
172. Zanetti M. A., Tedesco D. C., Schneider T., Tolotti Fraga Teixeira S., Daroit L., Pilotto F., Dickel E. L., Santos S. P. and Ruschel dos Santos L., 2018. Economic losses associated with wooden breast and white striping in broilers. *Ciencias agrarias*, **39**(2): 887-892.
173. Zebracki K. and Drotar D., 2008. Pain and activity limitations in children with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, **50**(7): 546-552.
174. Zhuang H. and Bowker B., 2018. The wooden breast condition results in surface discoloration of cooked broiler pectoralis major. *Poultry Science*, **97**(12): 4458-4461.
175. Zuidhof M. J., Schneider B. L., Carney V. L., Korver D. R. and Robinson F. E., 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science*, **93**(12): 2970-2982.



# ANNEXES

---

## Annexe 1 : Bibliographie personnelle

### ➤ Publications

- 2019** Pampouille E., Hennequet-Antier C., Praud C., Juanchich A., Brionne A., Godet E., Bordeau T., Banville M., Le Bihan-Duval E., Berri C. « Differential expression and co-expression analyses reveal molecular mechanisms and candidate biomarkers involved in breast muscle myopathies in chicken ». *Scientific Reports* [soumis].
- 2019** Baéza E., Le Bihan-Duval E., Pampouille E., Bourin M., Berri C. « Quelles stratégies pour limiter les problèmes de qualité de viande ? ». *XIII Journée de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*.
- 2019** Rupp R., Huau C., Caillat H., Fassier T., Bouvier F., Pampouille E., Clément V., Palhière I., Larroque H., Tosser-Klopp G., Jacquet P., Rainard P. « Divergent selection on milk somatic cell count in goats improves udder health and milk quality with no effect on nematode resistance ». *Journal of Dairy Science*.
- 2018** Pampouille E., Berri C., Boitard S., Hennequet-Antier C., Beauclercq S., Godet E., Praud C., Jégo Y., Le Bihan-Duval E. « Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens ». *BMC Genomics*.

### ➤ Communications

- 2019** Pampouille E., Hennequet-Antier C., Praud C., Juanchich A., Brionne A., Godet E., Bordeau T., Banville M., Le Bihan-Duval E., Berri C. « Modifications moléculaires et histologiques associées à des myopathies du muscle du filet chez le poulet de chair ». *XIII Journée de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*, Tours (France).
- 2018** Pampouille E., Hennequet-Antier C., Brionne A., Juanchich A., Praud C., Le Bihan-Duval E., Berri C. « Analyse fonctionnelle des données transcriptomiques : combinaison de plusieurs approches au service de la compréhension et de l'identification de biomarqueurs ». *Réunion groupe muscle-viande du département PHASE*, Tours (France).
- 2018** Pampouille E., Berri C., Boitard S., Hennequet-Antier C., Beauclercq S., Godet E., Praud C., Jégo Y., Le Bihan-Duval E. « Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chicken ». *World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Auckland (Nouvelle-Zélande) [poster].
- 2018** Pampouille E., Berri C., Boitard S., Hennequet-Antier C., Beauclercq S., Praud C., Jégo Y., Le Bihan-Duval E. « Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens ». *X<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Genetics*, Saint-Malo (France).



## Annexe 2 : Poster présenté au congrès WCGALP (Auckland) en février



# Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chicken

E. Pampouille<sup>1,2</sup>, C. Berri<sup>1</sup>, S. Boitard<sup>3</sup>, C. Hennequet-Antier<sup>1</sup>, S. Beauclercq<sup>1</sup>, E. Godet<sup>1</sup>, C. Praud<sup>1</sup>, Y. Jégo<sup>2</sup>, E. Le Bihan-Duval<sup>1</sup>

### Background

**White striping (WS)** is an emerging **muscular defect** occurring on breast and thigh muscles of **broiler chickens** and characterized by the presence of **white striations** parallel to the muscle fibers. This defect has significant consequences on **meat quality**, altering both its appearance, nutritional values and technological properties. The etiology of WS remains unknown but previous studies demonstrated that the prevalence of this defect is directly related to **broiler growth** and **muscle yield**. Moreover, recent studies showed **moderate to high heritability** values of WS, which emphasized the role of genetics in its determination.



The aim of this study was to specify the genetic and molecular mechanisms involved in the appearance of WS by identifying the first QTLs for WS as well as breast muscle yield and meat quality traits

### Materials

- Chicken **divergent lines** selected for **meat quality** through *Pectoralis major* **ultimate pH (pHu)** and concerned by **WS** defect
- 558** birds of the 6th generation of selection (**278** pHu + and **280** pHu -)
- Phenotyping** : WS, breast yield, color parameters of meat (L\*, a\*, b\*), drip and cooking loss, intramuscular fat, TBARS...
- Genotyping** : Illumina chicken SNP 57K Beadchip

Figure 1: Phenotypic evolution of pHu

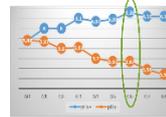
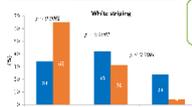
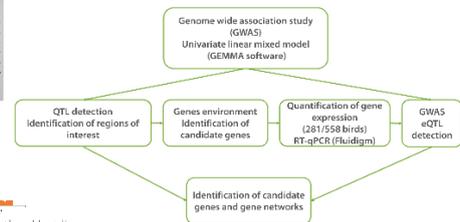


Figure 2: Incidence of WS is higher in the pHu+ line  
NORM: normal, MOD: moderate WS, SEV: severe WS



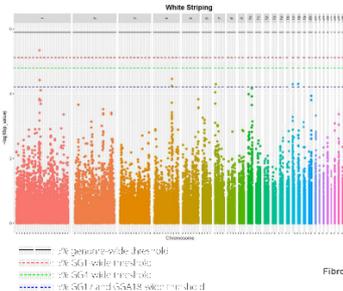
### Methods



### Results & Discussion

- 20** QTLs identified including **5** associated with WS on GGA **1, 4, 7, 17** and **18**

Figure 3: Manhattan plot showing the association between SNPs and WS



- 16** candidate genes identified including **13** for WS mostly involved in :

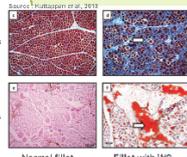
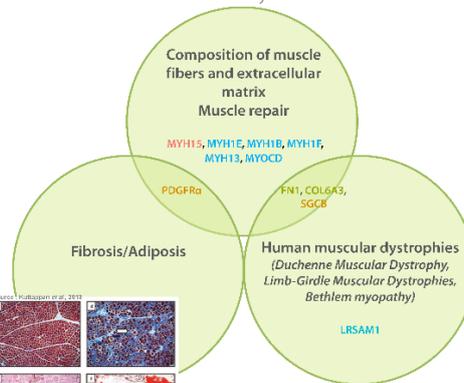


Figure 4: Transversal cross section, normal fillet vs WS fillet

- 19** eQTLs identified including **2** cis-eQTLs

Figure 5: Identification of cis-eQTL for MYH16

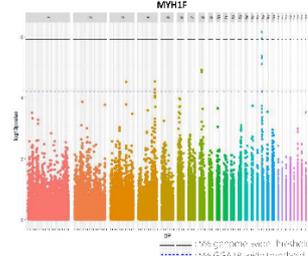
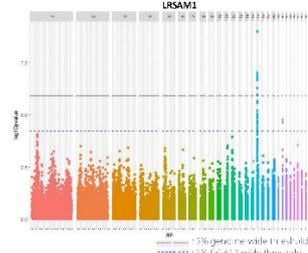


Figure 6: Identification of cis-eQTL for LRSAM1



- Several **co-localizations** between QTLs and eQTLs

Table 1: Co-localization on GGA4 between the pleiotropic region associated with meat quality traits and trans eQTL for FN1, COL6A3, CAPN3 and MYH13

Phenotype	GGA	SNP ID	Position** (pb)	P-value
Cooking losses, drip loss, L*, b*	4	Gga_rs16454745	91098157	1,59E-05 à 1,02E-08
FN1, MYH13	4	Gga_rs16454745	91098157	1,21E-05 à 1,27E-07
Cooking losses, drip loss	4	Gga_rs15648179	91195923	1,70E-06 à 1,76E-09
FN1, COL6A3, MYH13, CAPN3	4	Gga_rs15648179	91195923	1,62E-05 à 1,21E-06

Table 2: Co-localization on GGA17 between WS-QTL and LRSAM1 cis-eQTL: highlights LRSAM1 as putative causative gene

Phenotype	GGA	SNP ID	Position** (pb)	P-value
WS	17	Gga_rs15804842	2376482	5,07E-05
LRSAM1	17	Gga_rs12716	1901705	9,65E-10

### POLYGENIC DETERMINISM OF WS AND MEAT QUALITY TRAITS

CANDIDATE GENES INVOLVED IN COMPOSITION OF MUSCLE FIBERS, MUSCLE REPAIR, FIBROSIS, ADIPOSIS AND MUSCULAR DYSTROPHIES  
SEVERAL CO-LOCALIZATIONS QTLs/eQTLs WHICH SUGGEST CAUSATIVE GENES AND GENE NETWORKS INVOLVED IN THE VARIABILITY OF MEAT QUALITY TRAITS AND BREAST MEAT YIELD

<sup>1</sup>URA, INRA, 37380, Nouzilly, France, <sup>2</sup>Hubbard SAS Mauguérand, 22800, Le Foël - Quintin, France

<sup>3</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT, 31320, Castanet Tolosan, France





# **Analyse à haut débit du déterminisme de défauts musculaires impactant la qualité de la viande chez le poulet**

## **Résumé**

La filière avicole est confrontée à des défauts musculaires qui impactent la qualité de la viande de poulet. Des analyses génétiques et génomiques ont été menées en complément de mesures histologiques afin de mieux comprendre l'étiologie de ces défauts et contribuer au développement de nouveaux indicateurs et biomarqueurs utiles au diagnostic et à la sélection. L'étude a porté sur deux modèles génétiques complémentaires : (1) deux lignées divergentes de poulets sélectionnées sur le pH ultime du filet, et (2) une lignée à fort développement musculaire plus sévèrement affectée comparée avec une souche à croissance lente indemne de lésions. La thèse a permis de décrire les modifications métaboliques et structurales induites par la sélection à long terme sur la croissance et le rendement en filet ainsi que les dérégulations biologiques observées en cas de myopathies sévères. Elle a aussi conduit à l'identification des premières régions QTL contrôlant les défauts chez le poulet et à l'établissement d'un set de marqueurs géniques corrélés aux mesures histologiques des myopathies, qui une fois validé, servira d'outil d'aide à la sélection et à l'élevage.

**Mots clés :** poulet, défauts musculaires, qualité de la viande, génétique, génomique, biomarqueurs, sélection

## **Résumé en anglais**

Poultry industry is facing muscular defects which that impair chicken meat quality. Genetic and genomic studies were carried out in addition to histological measurements to better understand the etiology of these defects and to contribute to the development of new indicators useful for diagnosis and selection. Studies focused on two complementary genetic models: (i) two divergent chicken lines selected on breast meat ultimate pH and (ii) a line with strong muscular development more severely affected by the defects, which was studied in comparison with a slow-growing strain free from lesions. The thesis helped to describe the metabolic and structural changes induced by long-term selection on growth and breast muscle yield as well as the biological deregulations observed in case of severe myopathies. It also led to the identification of the first QTL regions controlling muscular defects in chicken and to the establishment of a set of genes correlated with histological measurements of myopathies that will serve after validation as tool for selection and breeding.

**Key words:** chicken, muscular defects, meat quality, genetics, genomic, biomarkers, selection